



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Producción heteróloga del factor de crecimiento epidérmico  
humano**

Tesis que presenta

**IBT. Erick Ricardo Corzo Toledo**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Directora de la Tesis: **Dra. Guadalupe Beatriz Xoconostle Cázares**

**Ciudad de México, México**

**Agosto 2023**

En el campo de la observación, la fortuna favorece solo a las mentes preparadas.

*Louis Pasteur*

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT-México) por la beca número 800801 recibida durante los dos años de la maestría.

Agradezco infinitamente a la Doctora Beatriz Xoconostle Cazares y al Doctor Roberto Ruíz Medrano por aceptarme en su grupo de investigación, por siempre brindar las condiciones para que se lleven a cabo experimentos exitosamente y por su guía en las dificultades que llegó a haber durante la realización del proyecto.

A la Doctora Berenice Calderón Pérez por su gran apoyo y orientación durante los experimentos de cultivo de tejidos y viabilidad celular.

Al M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz, auxiliar de investigación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el continuo apoyo técnico en los ensayos de biología molecular y en la purificación de proteínas.

A la M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández, auxiliar de investigación del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por el apoyo técnico.

Al Biólogo Jesús Pablo Gómez Islas del Departamento de Genética y Biología Molecular por el apoyo técnico para el cultivo *in vitro* de fibroblastos.

Agradezco a mi mamá y a mi hermano Dany por todo el amor, apoyo y aliento que me han brindado durante esta y todas las etapas de mi vida.

Agradezco a mi padre por haberme introducido al mundo de las ciencias biológicas y darme su ejemplo para la dedicación al estudio.

A Javier y Ángel por su amistad, apoyo y estar ahí, incluso cuando digo que no es necesario.

A mis compañeras y compañeros de posgrado: Rosa, Claret, Zuriel y Miguel por las experiencias y conocimientos compartidos.

A Miguel Ángel, Dani Nolasco, Alan, Víctor, Luis y Areli por su atención, curiosidad y hacerme descubrir el gusto por la enseñanza.

A todos los integrantes del laboratorio 12 y 24 del departamento de Biotecnología y Bioingeniería por hacer ameno y valioso cada día en el laboratorio.

# Índice

Agradecimientos .....	2
Índice .....	3
Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
1.1 Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF).....	11
1.2 Reparación de heridas.....	13
1.2.1. Fibroblastos .....	14
1.2.2. Aplicaciones del EGF en diferentes afectaciones.....	14
1.3 Producción de proteínas heterólogas .....	15
1.3.1 Sistemas hospederos.....	16
1.3.1.1 <i>Escherichia coli</i> como sistema de producción heterólogo.....	16
1.3.2 Vectores de expresión .....	18
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis .....	22
4. Objetivos .....	22
4.1 Objetivo General.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. Materiales y Métodos .....	23
5.1 Ensamblaje de oligonucleótidos sintéticos .....	23
5.2 Clonación T-A.....	26
5.3 PCR de colonias.....	27
5.4 Electroforesis en gel de agarosa .....	27
5.5 Extracción de plásmidos (Miniprep kit classic Zymo Research) .....	28
5.6 Digestión.....	29
5.7 Extracción de banda de DNA de gel de agarosa.....	30
5.8 Transformación.....	30
5.9 Inducción de <i>E. coli</i> .....	31

5.10 Expresión en <i>E. coli</i> Lemo21(DE3).....	31
5.11 Tricina-SDS-PAGE .....	32
5.12 Procesamiento de muestras inducidas en 10 mL .....	33
5.12.1 Procesamiento de muestras de espacio periplasmático .....	33
5.13 Lavado de Cuerpos de Inclusión (1 L) .....	33
5.14 Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot .....	35
5.15 Ensamblaje <i>in vivo</i> ( <i>In vivo</i> assembly) .....	37
5.16 Replegamiento del factor de crecimiento epidérmico .....	39
5.17 Ensayo de Bradford Quick Start (Biorad).....	39
5.18 Cultivo de fibroblastos .....	40
5.18.1 Descongelamiento de línea celular .....	40
5.18.2 Ensayo de proliferación MTT con hEGF .....	40
5.19. Producción de hEGF en fermentador aerobio de tanque agitado .....	42
6. Discusión y Resultados .....	44
6.1 Ensamblaje <i>in vitro</i> .....	44
6.2 Expresión de hEGF en <i>E. coli</i> transformada con pCri-8b-hEGF .....	49
6.3 Clonación de hEGF en el plásmido pCri-8a.....	51
6.4 Inducción de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada con pCri-8a .....	53
6.5 Clonación de hEGF en pCri-4a y pCri-12a .....	53
6.6 Inducción de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) con los plásmidos pCri-4a y pCri-12a .....	56
6.7 Producción y purificación de hEGF en matraz de dos litros .....	57
6.8 Mutagénesis dirigida mediante ensamblaje <i>in vivo</i> .....	59
6.9 Optimización de cepas de <i>E. coli</i> para la producción de hEGF .....	60
6.10 Producción y purificación de hEGF en matraz de dos litros .....	63
6.11 Ensayo de actividad biológica (ensayo de proliferación y viabilidad MTT) .....	65
6.12 Producción de hEGF en fermentador aerobio .....	67
7. Conclusiones.....	71
8. Recomendaciones .....	72
9. Bibliografía .....	73
Anexos .....	79
Anexo 1. Preparación de medio LB .....	79
Anexo 2. Buffer TBE 5X .....	80

Anexo 3. Reactivos para tricina SDS-PAGE.....	81
Anexo 4. Reactivos para inmunodetección por Western Blot.....	82
Anexo 5. Soluciones para curva de calibración y curva de BSA en PBS 1X mediante Bradford Quick Start (Biorad). ....	83
Anexo 6. Diseño del ensayo MTT para fibroblastos GM03440.....	85
Anexo 7. Ensamblaje del biorreactor.....	86
Antes de esterilizar .....	86
Esterilización.....	90
Después de esterilizar .....	91

## Índice de Figuras

Figura 1. Activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico. ....	12
Figura 2. Estructura secundaria del gen sintético .....	44
Figura 3. Secuencia de los oligonucleótidos Forward y Reverse (en azul se muestra la región complementaria entre los oligonucleótidos). Se muestran en dirección 5'-3'.	45
Figura 4. Ensamblaje in vitro de hEGF recombinante.....	45
Figura 5. Colonias de E. coli MACH1-T1 transformadas con el vector PCR-8-hEGF	46
Figura 6. PCR de colonias para el gen sintético hEGF .....	46
Figura 7. Resultados de la secuenciación para las colonias 2, 3 y 10 de E. coli Mach1 T1 .....	46
Figura 8. Representación esquemática del mapa del inserto hEGF en pCri-8b .....	47
Figura 9. Digestión de los vectores pCR8-GW-TOPO-hEGF y pCri-8b con las enzimas NcoI y HindIII.....	48
Figura 10. Confirmación de transformación del vector pCri-8b-hEGF en E. coli BL21 (DE3) mediante PCR de colonia (A) y secuenciación (B) .....	48
Figura 11. Inducción de E. coli BL21 (DE3) pCri-8b-hEGF con 1 mM IPTG .....	49
Figura 12. Inducción de las fracciones soluble e insoluble de las colonias 31, 71 y BL21 como control negativo.....	50
Figura 13. Cinética de inducción de E. coli BL21 (DE3) pCri-8b-hEGF con 1 mM IPTG .....	50
Figura 14. Representación esquemática del mapa del inserto hEGF en pCri-8a .....	51
Figura 15. Digestión del plásmido pCri-8 <sup>a</sup> con las enzimas NcoI y HindIII.....	51
Figura 16. Confirmación de transformación del vector pCri-8a-hEGF en E. coli BL21 (DE3) mediante PCR de colonia (A) y secuenciación (B) .....	52
Figura 17. PCR de colonias para hEGF en el vector pCri-8a en E. coli BL21 (DE3).	52
Figura 18. Inducción de E. coli BL21 (DE3) pCri-8a-hEGF con 1 mM IPTG .....	53
Figura 19. Representación esquemática del mapa del inserto hEGF en A) pCri-4a y B) pCri-12a .....	54
Figura 20. Digestión de pCR8/GW/TOPO-hEGF, pCri-4a y pCri-12a con las enzimas NcoI y HindIII.....	54
Figura 21. Confirmación de transformación del vector pCri-4a-hEGF en E. coli BL21 (DE3) mediante PCR de colonia (A) y secuenciación (B) .....	55
Figura 22. Confirmación de transformación del vector pCri-12a-hEGF en E. coli BL21 (DE3) mediante PCR de colonia (A) y secuenciación (B) .....	55
Figura 23. Inducción de E. coli BL21 (DE3) pCri-4a-hEGF y pCri-12a-hEGF con 1 mM IPTG.....	56
Figura 24. Comprobación de expresión de TrxA-hEGF mediante Western Blot .....	57
Figura 25. Inducción en 2 litros de E. coli BL21 (DE3) pCri-4a-hEGF.....	57
Figura 26. Cuerpos de inclusión solubilizados en urea 8 M .....	58
Figura 27. Cromatograma de la purificación de TrxA-hEGF mediante FPLC por afinidad a níquel .....	58

Figura 28. Diseño de oligonucleótidos para clonación in vivo. En rojo se señala la región rica en guaninas y la modificación en la secuencia pasando GGG a TTA .....	59
Figura 29. Gradiente de temperatura para el ensamblaje in vivo del vector pCri-8a-IVA .....	60
Figura 30. Resultados de secuenciación de pCri-8a-IVA.....	60
Figura 31. Inducción en diferentes cepas de E. coli. A. Inducción de BL21 (DE3); B. Inducción de SoluBL21; C. Inducción de Rosetta; D. Inducción de C43; E. Inducción de Shuffle .....	61
Figura 32. Inducción de E. coli Lemo21(DE3) con IPTG 1mM y L-Rhamnosa 100, 500 y 200 $\mu$ M .....	62
Figura 33. Inmunodetección de hEGF en E. coli Lemo21(DE3).....	62
Figura 34. Inducción en 2 litros de E. coli Lemo21(DE3) pCri-8a-IVA-hEGF .....	63
Figura 35. Cromatograma de la purificación de TrxA-hEGF mediante FPLC por afinidad a níquel .....	64
Figura 36. hEGF purificada por afinidad a $Ni^{+2}$ .....	64
Figura 37. Replegamiento de hEGF purificado .....	65
Figura 38. Estandarización del ensayo MTT para fibroblastos GM03440. A. Micrografía de fibroblastos con confluencia; B. Estandarización de la concentración celular inicial; C. Estandarización del medio para incubación en MTT. ....	66
Figura 39. Ensayo de viabilidad y proliferación con MTT para fibroblastos tratados con hEGF heteróloga o comercial. Se probaron las concentraciones de 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5 y 50 ng/ml.....	67
Figura 40. Cinética de crecimiento del fermentador aerobio .....	68
Figura 41. Cinética de pH durante la fermentación .....	68
Figura 42. Cinética de aireación y agitación .....	69
Figura 43. Cinética de expresión de hEGF en E. coli Lemo21(DE3) en fermentador aerobio .....	69



## Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> y sus características.....	17
Tabla 2. Características de las secuencias codificantes utilizadas por el sistema pCri .....	19
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para ensamblaje <i>in vitro</i> .....	23
Tabla 4. Programa de Temperaturas para el Ciclo de alineado .....	24
Tabla 5. Programa de Temperaturas para el ciclo de rellenado.....	24
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para PCR de fragmentos ensamblados .....	25
Tabla 7. Programa de Temperaturas para PCR de ensamblado .....	25
Tabla 8. Mezcla para la Clonación T-A .....	26
Tabla 9. Programa de Temperaturas para PCR de colonias .....	27
Tabla 10. Preparación de Agarosa al 2%.....	28
Tabla 11. Preparación de Agarosa al 0.8%.....	28
Tabla 12. Mezcla para digestión .....	29
Tabla 13. Reactivos para Gel Separador de Tricina SDS-PAGE 16%.....	32
Tabla 14. Reactivos para Gel Separador de Tricina SDS-PAGE 4%.....	32
Tabla 15. Oligonucleótidos diseñados para ensamblaje <i>in vivo</i> . .....	37
Tabla 16. Mezcla para Ensamblaje <i>in vivo</i> . .....	37
Tabla 17. Ciclo de temperatura para Ensamblaje <i>in vivo</i> . .....	38
Tabla 18. Concentraciones de hEGF recombinante y comercial para el ensayo MTT. .....	41
Tabla 19. Características de los vectores pCri con hEGF.....	47

## Resumen

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido compuesto por 53 aminoácidos, perteneciente a la familia de Factores de Crecimiento, que se encuentra presente en diferentes fluidos como saliva, orina, leche y plasma, además de células involucradas en el proceso de reparación de heridas como plaquetas y macrófagos.

Debido a su participación en el proceso de reparación de heridas, además de ser uno de los factores de crecimiento más estudiados, el EGF ha sido planteado como una molécula con un gran potencial terapéutico.

Diferentes estudios han encontrado usos de EGF para diferentes tipos de heridas o afectaciones en diversos estudios, entre ellos: tratamiento de úlceras causadas por diabetes, pie diabético, recuperación de heridas quirúrgicas, heridas en córnea y quemaduras, disminución en dermatitis causada por radioterapia y alopecia causada por quimioterapias; además, se ha demostrado que posee propiedades antienvjecimiento.

El EGF humano ha sido expresado y purificado en diferentes sistemas heterólogos, entre ellos *E. coli* y *S. cerevisiae*. Sin embargo, aunque ya se utiliza en productos terapéuticos, se continúan buscando estrategias para aumentar la producción y el rendimiento en estos sistemas. Por lo anterior, el objetivo principal de este proyecto fue expresar y purificar en *E. coli* el EGF humano, evaluando su actividad biológica.

En este trabajo se evaluó la expresión de EGF humano en *E. coli* utilizando diferentes vectores del sistema pCri y cepas de *E. coli*, logrando la expresión y purificación de EGF en la cepa Lemo21 (DE3) con el vector pCri-8a; se llevó la producción de EGF a 2 litros en un matraz agitado, llevando a cabo la purificación de EGF mediante FPLC de afinidad a Níquel, y se realizó el replegado para posteriormente verificar la actividad biológica en fibroblastos humanos mediante el ensayo de proliferación y viabilidad MTT, donde se obtuvo una actividad biológica entre los 0.005 y 50 ng/ml.

## **Abstract**

The Epidermal Growth Factor (EGF) is a polypeptide of 53 amino acids which is present in several fluids such as saliva, urine, milk, plasma, and in cells involved in wound healing like macrophages and platelets.

The EGF has been identified as a molecule with important therapeutical potential due to its involvement in wound healing, as well as being one of the most studied growth factors. In different studies, several applications have been found such as wound treatment, including diabetic feet, diabetic ulcers, healing of surgical, corneal and burn wounds, as well as reducing radiotherapy-induced dermatitis and chemotherapy-induced alopecia, in addition to having anti-aging properties.

Even though human EGF has been expressed and purified in different heterologous systems, like *E. coli* and *S. cerevisiae*, new strategies to increase the production and yield in these systems are still being developed. Thus, the aim of this project was to express and purify the human EGF in *E. coli* as well as to evaluate its biological activity.

In this project the expression of human EGF on *E. coli* was evaluated by using different vectors of the pCri system, as well as *E. coli* strains. EGF was successfully produced on the Lemo21 (DE3) strain modified with the pCri-8a vector; the production was scaled to 2 liters in a stirred flask, purifying EGF through IMAC-FPLC; the purified EGF was refolded and the biological activity was evaluated with the cell viability and proliferation MTT assay using human fibroblasts, the purified and refolded EGF showed activity between 0.005 and 50 ng/ml.

# 1. Introducción

## 1.1 Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un polipéptido que posee un precursor de 1207 aminoácidos y, después de ser procesado proteolíticamente, en su forma madura se encuentra compuesto de 53 aminoácidos (6.7 KDa) con tres puentes disulfuro intramoleculares necesarios para su actividad biológica. Pertenece a la familia de Factores de Crecimiento, es producido por epitelios y se encuentra presente en diferentes fluidos como saliva, orina, fluido seminal, fluido amniótico, leche y plasma, además de células involucradas en el proceso de reparación de heridas como plaquetas y macrófagos (Cialdai et al, 2022).

El EGF fue descubierto por Stanley Cohen mientras trabajaba con extracto de glándulas salivales de ratón en 1962, y en 1975 aisló el EGF humano (hEGF) de orina. Se ha descrito que este factor se encuentra involucrado en migración, adhesión, supervivencia, diferenciación de diferentes tipos celulares, factor protector de mucosa en el tracto gastrointestinal, entre otras funciones (Carpenter y Cohen, 1979; Collins y Cohen, 1963; Esquirol Caussa y Herrero Vila, 2016).

El receptor del EGF (EGFR) es una proteína transmembranal con actividad tirosina cinasa, tiene una conformación de monómero inactivo hasta que entra en contacto con el EGF, lo que le permite adquirir su conformación dimérica activa. Este complejo fosforilado induce la actividad de las vías PI3K/AKT/mTOR junto con la de las MAPK, que culminan con la activación de mTOR (mammalian target of rapamycin) que a su vez regula la activación de factores de transcripción que codifican para supervivencia, oncogénesis, división celular y proliferación (Figura 1). El complejo EGF-EGFR está involucrado en inflamación, angiogénesis, migración celular, y proliferación de fibroblastos y queratinocitos (Zhou et al, 2013).

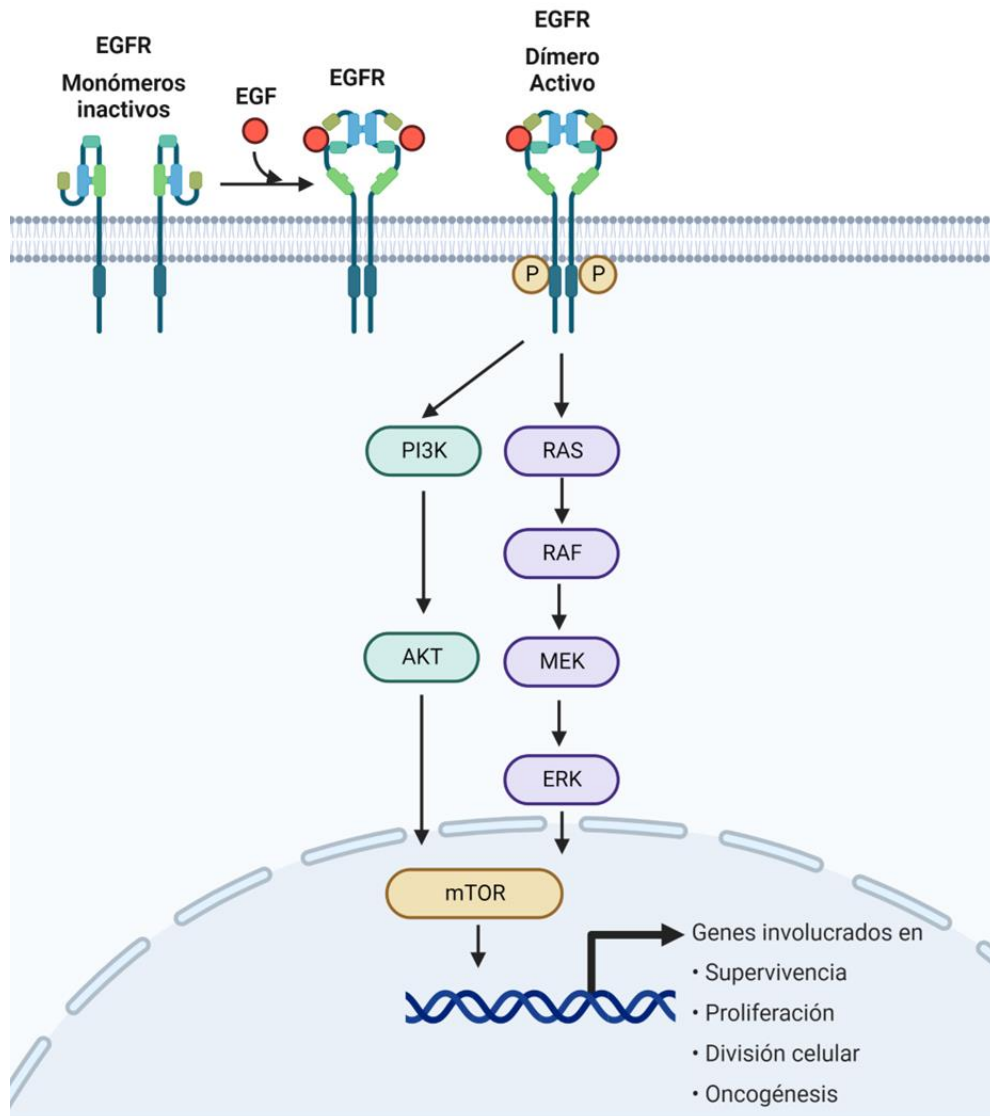


Figura 1. Activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) adquiere su conformación dimérica activa después de entrar en contacto con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Una vez activada es fosforilada, desencadenando las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y de las Ras cinasas, que regulan genes involucrados en supervivencia, proliferación, división celular, oncogénesis (modificado de Ramaiah, 2021).

## 1.2 Reparación de heridas

La reparación de heridas es un proceso de múltiples etapas en animales y humanos que requiere de la coordinación de diversos tipos de células y moléculas de señalización en el sitio de la herida. Consta de múltiples procesos, gobernados por fases secuenciales, incluyendo la fase de hemostasis, inflamación, proliferación (también llamada reepitelización) y remodelación (Wang et al, 2017).

En la fase de hemostasis, después de una herida en la piel, tanto colágeno, factor tisular y el subendotelio expuesto activan la agregación de plaquetas, que resulta en la desgranulación y secreción de quimiocinas y factores de crecimiento para formar un coágulo y evitar una mayor pérdida de sangre (Ridiandries et al, 2018; Wang et al., 2017).

En la fase de inflamación, gracias a la secreción de quimiocinas, ocurre la llegada de neutrófilos para la remoción de células muertas, residuos y cuerpos ajenos a la herida para facilitar la migración, proliferación y diferenciación de células endoteliales, posteriormente, los macrófagos llegan a la herida para fagocitar bacterias y tejido dañado, además de secretar factores de crecimiento. En esta fase, el EGF induce el crecimiento de fibroblastos y quimiocinas (Ridiandries et al, 2018; Wang et al., 2017; Esquirol Causa, 2016; Ilkeli et al, 2018).

La fase de proliferación se caracteriza por la acumulación de células y tejido conectivo, con una alta presencia de células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y colágeno tipo III en el área de la herida, conformando de manera temporal la matriz extracelular (ECM). En esta fase, el EGF regula diferentes factores y se encuentra involucrado en la fase proliferativa, en la cual se acumulan diferentes células para reemplazar al coágulo con la ECM (Ridiandries et al, 2018; Ilkeli et al, 2018).

La fase de remodelación es un balance entre apoptosis de células existentes y producción de células nuevas, la degradación de la ECM y colágeno tipo III, este último siendo reemplazado por colágeno tipo I, el cuál es más resistente y permanente (Ridiandries, 2018; Wang et al., 2017).

### **1.2.1. Fibroblastos**

Los fibroblastos son células elongadas fusiformes, dedicadas a la creación y mantenimiento de tejidos conectivos que forman la ECM, la cual se encarga de brindar soporte y estructura a diferentes tejidos celulares y órganos como: piel, pulmones, corazón, hígado, riñón y ojos; los fibroblastos son capaces de mandar señales como citocinas, permitiendo la respuesta a estímulos externos como heridas (Cialdai et al, 2022).

Los fibroblastos producen diversas moléculas como colágeno de tipo I, III y IV, proteoglicanos, fibronectina, lamininas y glicosaminoglicanos, entre otras.

El crecimiento de fibroblastos *in vitro* depende de la presencia de factores de crecimiento y en diferentes estudios se ha utilizado el EGF para cubrir esta necesidad (Carpenter y Cohen, 1976).

Los fibroblastos son capaces de regenerar tejido funcional ya que están involucrados en diferentes las fases del proceso de reparación de heridas: inflamación, proliferación y remodelación (Cialdai et al, 2022).

### **1.2.2. Aplicaciones del EGF en diferentes afectaciones**

Debido a su participación en el proceso de reparación de heridas, además de ser uno de los factores de crecimiento más estudiados, el EGF ha sido reportado como una molécula con gran potencial terapéutico.

Se han encontrado usos para tratar diferentes tipos de heridas o afectaciones en diferentes estudios:

- En úlceras causadas por diabetes se ha visto una aceleración en la recuperación al usar un gel tópico que contiene el EGF en la herida. Además, en ratas, con y sin diabetes, se ha visto una mejora en la reparación de heridas (Tiaka et al, 2012; Dogan et al, 2009).
- En estudios con ratones, al aplicar una mezcla de factores de crecimiento (EGF, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento humano de queratinocitos, y superóxido dismutasa), se observó una mejora en la proliferación, migración y síntesis de colágeno tipo I, presentando un

aceleramiento en la reparación de heridas, así como un aumento en la tasa de re-epitelización (Lee et al, 2014).

- Las heridas quirúrgicas o causadas por objetos punzocortantes suelen presentar dificultad durante la reparación de heridas, pero al utilizar el EGF se ha observado una mejora en el proceso (Esquirol Causa y Herrero Vila, 2016).
- El EGF juega un papel importante en la migración y proliferación de células epiteliales en la córnea, mejorando el proceso de reparación de heridas (Wang et al, 2013).
- También se ha visto que el EGF tiene propiedades antienvjecimiento en la piel, sirviendo para disminuir arrugas y manchas de edad (Schouest et al, 2012).
- En pacientes con cáncer de mama tratados mediante radioterapia se utilizó una crema que contenía EGF y se observó un efecto benéfico en la prevención de dermatitis causada por radiación, así como su disminución (Kong, 2013).
- En ratones que padecían alopecia como resultado de quimioterapia se observó que al inhibir el EGFR se suprimió la alopecia (Bichsel et al, 2013).
- En ratas se observó que el tiempo de reparación de quemaduras presentó una disminución de dos días después de la aplicación del EGF humano recombinante (rhEGF), además de una mejora en la granulación (Zheng et al, 2003).
- También, debido a los efectos en alopecia causada por quimioterapia, se especula que podría servir para combatir otros tipos de alopecia, como cicatriciales y no cicatriciales (Esquirol Causa y Herrero Vila, 2016).

### **1.3 Producción de proteínas heterólogas**

La expresión heteróloga consiste en la introducción de un gen o parte de él en un organismo que no lo posee naturalmente y favorecer su síntesis proteica. Es una herramienta ampliamente utilizada para la producción de proteínas de interés comercial.



La expresión de proteínas recombinantes requiere de dos componentes principales: un sistema hospedero y un vector de expresión (Rosano et al, 2014).

### **1.3.1 Sistemas hospederos**

Para la expresión heteróloga se utilizan diferentes sistemas hospederos:

- Bacterias
- Levaduras
- Células de mamíferos
- Células de insectos
- Plantas

La selección del hospedero se realiza considerando las características fisicoquímicas y modificaciones postraduccionales de la proteína de interés, ya que no todos los sistemas cuentan con la maquinaria necesaria para llevarlas a cabo (Rosano et al, 2014).

#### **1.3.1.1 *Escherichia coli* como sistema de producción heterólogo**

Uno de los sistemas más utilizados en la producción de proteínas heterólogas es *E. coli* debido a la facilidad con la que puede ser cultivada en laboratorio, a su rápido tiempo de crecimiento y a que es un organismo ampliamente estudiado, para el cual, existe una gran variedad de herramientas genéticas y métodos disponibles para inducir la expresión de péptidos (Kaur et al, 2017).

Algunos de los problemas que presenta este organismo para la producción de proteínas recombinantes son la falta de un sistema de secreción eficiente hacia el medio de cultivo, que favorecería la posterior purificación de la proteína de interés. En contraste, cuando se acumula la proteína, la estrategia de la célula es acumularla en forma insoluble, generando así cuerpos de inclusión.

El hEGF ha sido expresado y purificado en sistemas heterólogos, tanto en levadura como en *E. coli*. En 1985, el EGF fue producido por primera vez en esta bacteria a partir de un gen sintético fusionado con una péptido señal para su transporte al espacio periplasmático permitiendo su uso experimental y clínico (Oka et al.,1985). Sin

embargo, a la fecha se siguen buscando estrategias para mejorar el rendimiento de la proteína activa, ya que se ha observado que puede afectarse por un incorrecto plegamiento de los puentes disulfuro del péptido y su agregación en cuerpos de inclusión.

Existen cepas de *E. coli* optimizadas para diferentes necesidades, como la formación de puentes disulfuro, el uso de codones humanos, la producción de proteínas citotóxicas, entre otras características. A continuación, se presentan las cepas utilizadas en este trabajo (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *E. coli* y sus características

<b>Cepa</b>	<b>Características</b>
BL21 (DE3)	Es una de las cepas más utilizadas en la producción de proteínas. Contiene el profago DE3 que posee el gen que codifica T7 RNA polimerasa, permitiendo la inducción con IPTG; no contiene lon proteasa ni la proteasa de membrana OmpT, reduciendo la degradación de proteínas heterólogas.
SoluBL-21	Cepa optimizada para la expresión soluble de proteínas provenientes de mamíferos, generada mediante evolución dirigida de BL21.
Rosetta	Cepa derivada de BL21 y diseñada para mejorar la expresión de proteínas de origen eucarionte, ya que poseen un plásmido con tRNAs para codones poco utilizados por <i>E. coli</i> y presentes en mamíferos (Tegel, 2010).
C43	Cepa derivada de BL21(DE3), posee mutaciones que evitan la muerte celular asociada a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas (Wagner, 2008).
Shuffle	Derivada de <i>E. coli</i> K12 para promover la formación de puentes disulfuro en el citoplasma, expresa constitutivamente la

isomerasa DsbC que funciona como chaperona para la formación de puentes disulfuro; posee una copia cromosomal de T7 RNA polimerasa (Lobstein, 2012).

Lemo21(DE3)

Derivada de BL21(DE), posee el plásmido pLemo que expresa lisozima Y (inhibidor de T7 RNA polimerasa) y es inducido con L-rhamnosa por lo que el nivel de expresión puede ser regulable con diferentes concentraciones del inductor.

Su nombre proviene de la frase **Less is more**, ya que con la expresión de la lisozima hay una menor expresión de proteína de interés, pero se reducen los efectos negativos de la sobreexpresión (Schlegel, 2013).

### 1.3.2 Vectores de expresión

Un vector de expresión es un plásmido bacteriano diseñado para que un gen sea transcrito y/o traducido en un sistema bacteriano. Los vectores de expresión contienen todos los elementos necesarios para la expresión de genes heterólogos: sitio de origen, promotor, marcador de selección, y sitios de clonación múltiple.

#### 1.3.2.1 Sistema pCri

El sistema pCri es una colección de vectores diseñada para la producción, a gran escala, de proteínas recombinantes que permite la sobreexpresión de proteínas. Los vectores incluidos en esta colección poseen diferentes características como etiquetas de histidina, proteína de unión a maltosa (MBP), sitios TEV; así mismo, permiten la producción de proteínas fusionadas a Trx, SUMO, LSL e incluso algunos poseen péptido señales como ompA, factor  $\alpha$ , pelB y samyQ (Goulas et al, 2014.)

Tabla 2. Características de las secuencias codificantes utilizadas por el sistema pCri

Secuencia codificante (CDS)	Descripción
Etiqueta de histidina (His <sub>6</sub> )	Es uno de los sistemas de purificación más utilizados, consiste en la adición de seis residuos del aminoácido histidina (His <sub>6</sub> ) al inicio o al final de la secuencia proteica que permiten el uso de cromatografía por afinidad a metales inmovilizados, ya que los anillos aromáticos de las histidinas interactúan con los iones de un ion metálico divalente como níquel o cobalto; posteriormente, se realiza una elución con imidazol que compite con los anillos aromáticos de las histidinas, permitiendo así la liberación de la proteína purificada (Spriestersbach et al, 2015).
MBP	Permite la purificación mediante cromatografía de afinidad, facilita la expresión y el replegado apropiado de la proteína, además de mejorar la solubilidad (Lebendiker et al, 2011).
Sitios TEV	Formadas por la secuencia ENLYFQ que es reconocida por la proteasa TEV permitiendo la remoción de etiquetas de afinidad como MBP o His <sub>6</sub> y la separación de proteínas fusionadas (Nam et al, 2020).
Trx	La tiorredoxina proviene de <i>E. coli</i> y es una proteína de fusión que permite la expresión de proteínas solubles en el citoplasma bacteriano, ayuda al replegado y brinda estabilidad térmica (McCoy et al, 2001).
SUMO	La proteína modificadora pequeña tipo ubiquitina ( <b>s</b> mall <b>u</b> biquitin-like <b>m</b> odifier) mejora la producción en sistemas de producción eucarióticos y procariontes, mejorando la solubilidad y estabilidad de la proteína; también permite la separación mediante el uso de proteasas específicas para sumo (Panavas et al, 2009).

MISTIC		Proteína de fusión, proveniente de <i>Bacillus subtilis</i> , que mejora los niveles de expresión de proteínas integrales de membrana foráneas (Silva Alves et al, 2017).
Péptido ompA	señal	Es un péptido señal, proveniente de <i>E. coli</i> , que permite la secreción de la proteína de interés en el espacio periplasmático (Mirzadeh et al, 2020).
LSL		La lectina hemolítica proveniente de <i>Laetiporus sulphureus</i> posee una alta afinidad hacia la sefarosa, lo que permite su purificación mediante cromatografía (Angulo et al, 2011).

## 2. Justificación

La cicatrización de heridas es un proceso natural que puede estar comprometido por la extensión de la lesión y también en pacientes con comorbilidades, pudiendo representar complicaciones como infecciones secundarias.

Las heridas crónicas son aquellas que presentan un tiempo de recuperación mayor a un mes y suelen estar asociadas a enfermedades como obesidad o diabetes. De acuerdo con datos del INEGI de 2021, se estima que en México el 10.3% de la población mayor a 20 años padece diabetes y el 36.1% presenta obesidad.

A nivel mundial, la federación internacional de diabetes estima conservadoramente que, al menos, 578 millones de personas padecerán esta enfermedad para el año 2030. Estos pacientes tienen procesos de cicatrización lentos y con frecuencia se presentan infecciones bacterianas secundarias que los incapacitan por tiempos prolongados.

Por ello, el uso de moléculas terapéuticas con propiedades cicatrizantes puede mejorar sustancialmente la calidad de vida de pacientes que padecen estas enfermedades. A nivel mundial, se estima que el mercado dedicado a la curación de heridas alcanzará un valor de 18.7 billones de dólares para 2027.

El EGF es un polipéptido compuesto por 53 aminoácidos, perteneciente a la familia de los factores de crecimiento, que se encuentra presente en diferentes fluidos como saliva, orina, leche y plasma, además de ser sintetizado por células involucradas en el proceso de reparación de heridas como plaquetas y macrófagos. Debido a su participación en el proceso de reparación de heridas, así como por ser uno de los factores de crecimiento más estudiados, el factor de crecimiento epidérmico ha sido planteado como una molécula con un gran potencial terapéutico.

La producción biotecnológica del hEGF se realiza empleando sistemas recombinantes heterólogos, entre ellos, destacan las plataformas en *E. coli* y *S. cerevisiae*. Aunque ya se llega a utilizar en productos terapéuticos, se continúan buscando estrategias para aumentar la producción y el rendimiento en estos sistemas.

### **3. Hipótesis**

- La producción del factor de crecimiento epidérmico recombinante por vía microbiana producirá biomoléculas con actividad biológica similar a la nativa.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo General**

- Expresión en *E. coli* y purificación del factor de crecimiento epidérmico humano.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Diseñar del gen sintético que codifica para el EGF.
- Secuenciar y subclonar en vector de expresión.
- Expresar la proteína recombinante en *E. coli*.
- Caracterizar bioquímicamente a hEGF.
- Evaluar la actividad biológica.
- Escalar la producción en fermentador aerobio.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Ensamblaje de oligonucleótidos sintéticos

Utilizando la región del péptido maduro de la secuencia P01133 de la base de datos Uniprot, se realizó optimización de codones para *E. coli* en la plataforma IDT ([www.idt.com](http://www.idt.com)), y se diseñó un gen sintético agregando codones de inicio y paro, así como los sitios de restricción NcoI y HindIII, el gen sintético fue dividido en dos oligonucleótidos de 99 y 100 pares de bases con 23 pares de bases complementarias. Se reconstituyeron los oligonucleótidos liofilizados, antes de abrirlos, se realizó un spin en la centrífuga para asegurarse de que los oligonucleótidos permanezcan en el tubo. Para el oligonucleótido HuEGF Opt ENS-F se utilizaron 264.2  $\mu$ l de agua grado biología molecular (milli-Q) y para HuEGF Opt ENS-R se agregaron 262.2  $\mu$ l para tener una concentración de 100 ng/ $\mu$ L, y se preparó una alícuota de trabajo de 10 ng/ $\mu$ L de cada oligonucleótido.

Se preparó la mezcla para el ciclo de alineado con un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía 1  $\mu$ l de los oligonucleótidos HuEGF Opt ENS-F y HuEGF Opt ENS-R (10 ng/ $\mu$ l), 12.5  $\mu$ l de agua milli-Q y 4  $\mu$ l de Buffer HF 5x. La mezcla se sometió al ciclo de alineado mostrado en la tabla 4.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para ensamblaje *in vitro*

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Oligonucleótido A (HuEGF Opt ENS-F)	CCATGGGGA ACTCTGACTCAGAATGTCCCCTTTCACA TGATGGTTATTGCTTGCACGATGGGGTATGCATGTATA TAGAGGCTTTGGACAAATACGCAT
Oligonucleótido B (HuEGF Opt ENS-R)	AAGCTTTTAGCGCAGCTCCCACCATTTAGGTCCCGG TATTGACATCTTTCCCCTATGTACCCTACTACGCAATTA CATGCGTATTTGTCCAAAGCCTCT



Tabla 4. Programa de temperaturas para el ciclo de alineado

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
94	5
94 - 84	-
84 - 25	-
16	∞

Una vez completado el alineado, se agregó 1 µl de dNTPs (2.5 mM) y 0.5 µl de polimerasa Phusion High Fidelity (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), y se siguió el programa de temperatura de la tabla 5 para el relleno del alineamiento.

Tabla 5. Programa de temperaturas para el ciclo de relleno

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
50	2
60	2
72	5
80	2
72	5
16	-

### 5.1.1 PCR

Se comenzó por reconstituir los oligonucleótidos Forward y Reverse, que amplifican el gen sintético de EGF, iniciando en el sitio de restricción NcoI y terminando en el sitio de HindIII (Tabla 6) con 247.9 µl y 239.9 µl, respectivamente, para obtener una concentración de 100 ng/µl. Después, se realizó una dilución para obtener una concentración final de 10 ng/µl de cada oligonucleótido. La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos es de 61 y 64°C.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para PCR de fragmentos ensamblados

Oligonucleótido	Secuencia
Forward 5'	CCATGGGGAACTCTGACTCAGAATGT
Reverse 3'	AAGCTTTTAGCGCAGCTCCCACCAT

Se preparó una mezcla de reacción que contenía 43.2 µl de agua, 7.5 µl de buffer 10X, 6 µl de dNTPs (2.5 mM), 6 µl de Oligonucleótido Forward, 6 µl de Oligonucleótido Reverse y 0.3 µl de polimerasa Phusion High Fidelity. La mezcla fue dividida en seis muestras, a cinco de las cuales se les agregaron 5 µl del ensamblado y una muestra se utilizó como un control con nucleótidos, sin DNA (NTC), completando el volumen final con agua.

Para determinar la temperatura óptima para el alineamiento se realizó un gradiente (55 °C, 60°C y 70°C) de acuerdo al programa mostrado en la tabla 5, con 34 ciclos.

Tabla 7. Programa de temperaturas para PCR de ensamblado

Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
94	3 min	Desnaturalización
94	30 s	
TM	30 s	Hibridación
72	30 s	Elongación
72	5 min	
16	-	

Se corroboraron los resultados corriendo en un gel de agarosa al 2%.

## 5.2 Clonación T-A

Una vez realizado el ensamblaje *in vitro*, se realizó una mezcla de reacción para insertar el gen sintético en el plásmido pCR8/GW/TOPO, aprovechando los extremos de Adenina del producto de PCR insertados por la Taq polimerasa como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Mezcla para la clonación T-A

Reactivo	Cantidad (µl)
Agua	0.5
pCR8/GW/TOPO	0.5
Solución salina	1
Producto de ensamblaje	4
Total	6

Se incubó la reacción por 20 horas a 22°C. Posteriormente, se transformó un vial de *E. coli* MACH1-T1 con los 6 µL de la clonación T-A (ver sección 5.8).

### 5.3 PCR de colonias

Se seleccionaron colonias transformadas buscando las que se encontraran aisladas de otras colonias. Utilizando palillos estériles, se tomó un poco de las colonias por analizar, se hizo una placa maestra y se sumergieron en una mezcla de PCR que contenía 8.2 µl de agua, 1.25 µl de Buffer 10X, 1 µl de dNTPs, 1 µl de Oligonucleótido Forward, 1 µl de Oligonucleótido Reverse (Tabla 6) y 0.05 µl de Taq polimerasa. Se utilizó un tubo con mezcla de PCR como NTC completando el volumen final de 12.5 µL con agua. Se realizaron 34 ciclos con el programa de la Tabla 9.

Tabla 9. Programa de temperaturas para PCR de colonias

Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
94	3 min	Desnaturalización
94	30 s	
70	30 s	Hibridación
72	30 s	Elongación
72	5 min	
16	-	

Como control positivo se utilizó el gen ensamblado sintéticamente y como control negativo una colonia transformada con otro gen. Se corroboró la reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

### 5.4 Electroforesis en gel de agarosa

Dependiendo de concentración final de agarosa deseada en el gel (para fragmentos pequeños se utilizó al 2.0 % [Tabla 10] y para plásmidos completos se utilizó al 0.8 % [Tabla 11]), se mezclaron los reactivos correspondientes y se calentó la mezcla en microondas por 3 min, agitando cada 30 segundos para homogenizar, hasta que se tuviera una apariencia transparente y sin grumos.

Se colocaron 5 µL de marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

Las muestras se prepararon con una proporción de 1:6 de buffer de carga, asegurándose de que los pozos se encontraran en el polo negativo de la cámara de electroforesis (marcada con color negro) y se corrió el gel a 90 V por 50 minutos.

Tabla 10. Preparación de agarosa al 2%

Reactivo	Cantidad
Buffer TBE	100 ml
Agarosa	2 g
Bromuro de etidio	5 $\mu$ L

Tabla 11. Preparación de agarosa al 0.8%

Reactivo	Cantidad
Buffer TBE	100 ml
Agarosa	0.8 g
Bromuro de etidio	5 $\mu$ L

Los geles se visualizaron en el transiluminador BioRad ChemiDoc XRS+, utilizando una configuración para bromuro de etidio en el software Image Lab.

### 5.5 Extracción de plásmidos (Miniprep kit classic Zymo Research)

Se centrifugaron 5 ml de *E. coli* en medio LB líquido, incubado overnight a 37°C en agitación, a 10,000 x g durante 1-2 minutos (en caso de que sea más de 1 ml se repite el proceso varias veces hasta haber procesado todo el volumen). Se agregaron 200  $\mu$ L de Buffer P1 (color rojo) y se resuspendió el pellet agitando vigorosamente (usando el vórtex). Se agregaron 200  $\mu$ L de Buffer P2 (color azul), se mezcló suavemente (solamente invirtiendo el tubo) y se incubó durante 2 minutos.

Se agregaron 400  $\mu$ L de Buffer P3 (color amarillo) y se mezcló en el vórtex hasta observar hebras blancas flotando en la mezcla.

Se centrifugó a 16,000 x g por 5 minutos y se cargó el sobrenadante en la columna de extracción. Posteriormente se centrifugó por 1 minuto a 10,000 x g y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 µL de Endo Wash Buffer y se centrifugó 1 minuto a 10,000 x g, para después agregar 400 µL de Plasmid Wash Buffer y centrifugar por 1 minuto a 10,000 x g. Se descartó el filtrado y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 x g.

Se colocó una columna en un tubo nuevo y se agregaron 30 µL de agua milli-Q (previamente calentada a 60°C), se dejó en reposo por 6 minutos y se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 x g.

## 5.6 Digestión

Se realizó una reacción de digestión con las enzimas NcoI y HindIII, ambas tienen una actividad del 100% en el Buffer Cutsmart 10X. Para corroborar la inserción del EGF en pCR8/GW/Topo, se utilizó la mezcla de la Tabla 12 en un microtubo incubando por 16 horas a 28°C.

*Tabla 12. Mezcla para digestión*

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	Aforar al volumen final
Cutsmart 10X	2.0 µL
DNA (3 µg)	Calcular volumen para 3 µg
HindIII-HF (NEB)	0.5 µL
NcoI (NEB)	0.5 µL
Vol. final	20 µL

## 5.7 Extracción de banda de DNA de gel de agarosa

Se utilizó el Zymoclean Gel DNA recovery kit (catalogo D4002, Zymo Research, Orange, CA).

Se pesaron los microtubos utilizados para recuperar la banda, se extrajo el fragmento de DNA correspondiente al gen sintético (183 pb) y a los vectores pCri-4a (5683 pb), pCri-8a (5383 pb), pCri-8b (5383 pb) y pCri-12a (4483 pb) del gel utilizando una navaja (se utilizó la mica a prueba de luz UV en el transiluminador para localizar la banda y ver dónde se debía cortar). Se determinó el peso de la agarosa con la diferencia entre el peso del tubo y con la agarosa. Se agregaron 3 volúmenes de ADB por cada volumen de agarosa (100 mg equivalen a 100  $\mu$ L). Se incubó el tubo a 55°C durante 10 minutos, hasta que el gel estuviera completamente disuelto y se transfirió la solución de agarosa derretida a una columna zymo spin en un tubo de colección. Se añadieron 200  $\mu$ L de DNA wash buffer a la columna y se centrifugaron por 1 minuto a 10,000 x g. Posteriormente, se volvió a centrifugar 1 minuto a 10,000 x g y se agregaron 10-15  $\mu$ L de agua milli-Q, dejando 5 minutos a temperatura ambiente. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 x g.

## 5.8 Transformación

Se siguió la siguiente metodología para transformar las cepas Mach1 T1, BL21, Rosetta 2, SoluBL21 y Lemo21.

Se tomó un vial de células competentes y se le agregaron 5  $\mu$ l de mezcla de ligación o producto de PCR (en el caso Mach1 T1), y se mezcló suavemente (girando el tubo suavemente). Se incubaron los viales en hielo por 30 min, agitando ocasionalmente dándole una vuelta al tubo en el hielo; posteriormente, se calentaron por 53 s a 42°C en termoblock. Pasado este tiempo, se retiraron del baño de agua y se colocaron en hielo por 2 minutos. Se agregaron 250  $\mu$ l de medio SOC (**S**uper **O**ptimal broth with **C**atabolite repression) y fueron incubadas a 37°C por 1 h a 225 rpm. Finalmente, se sembraron en placas con el antibiótico adecuado para cada vector, se utilizaron 25-

100  $\mu$ l y se sembraron por extensión; se sembraron 25  $\mu$ l en el resto del vial en otra placa, ambas se incubaron a 37°C toda la noche.

### **5.9 Inducción de *E. coli***

Se siguió la siguiente metodología para las cepas BL21 (DE3), Rosetta, Shuffle y SoluBL21 (DE3).

Se sembraron en 10 ml de medio LB líquido las colonias que se van a inducir, se colocaron a 37°C y 225 rpm durante un periodo de entre 4 y 5 horas. Posteriormente, se agregaron 10  $\mu$ L de IPTG 1 M y se incubaron a 16°C y 180 rpm toda la noche.

### **5.10 Expresión en *E. coli* Lemo21(DE3)**

Se transformó Lemo21 con el plásmido pCri-8a-IVA, se sembraron las células transformadas en medio con kanamicina 1mM y 30  $\mu$ g/mL de cloranfenicol, y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente, se resuspendió una colonia en 1 ml de medio con cloranfenicol y kanamicina para hacer un preinóculo.

Partiendo del preinóculo se prepararon tubos de 10 ml con la concentración deseada de L-rhamnosa (se probaron las concentraciones de 100, 500 y 2000  $\mu$ M). Los tubos se inocularon con 200  $\mu$ l de preinóculo. Se incubaron los tubos a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.8, para posteriormente inducir con 40  $\mu$ l de IPTG 100 mM, y se incubaron a 30 o 37°C por lo menos 5 horas, se corroboró la expresión mediante SDS-PAGE.

Para la producción a mayor escala (2 L), se preparó un litro de medio con Kanamicina y cloranfenicol, y la concentración óptima de L-rhamnosa (100  $\mu$ M, que fue previamente determinada a pequeña escala). Este litro fue inoculado con un preinóculo de 10 ml y se siguió el mismo proceso descrito anteriormente para los tubos de 10 ml.



## 5.11 Tricina-SDS-PAGE

Se prepararon los geles de tricina SDS-PAGE preparando el gel separador al 16% y el concentrador al 4%, siguiendo las cantidades de la Tabla 13 y la Tabla 14, respectivamente.

*Tabla 13. Reactivos para gel separador de tricina SDS-PAGE 16%*

<b>Separador</b>	<b>16% (4 geles)</b>
AB-3 (mL)	10
Buffer de gel (mL)	10
Glicerol (ml)	3.75 (80)
Volumen final (ml)	30
APS 10% ( $\mu$ l)	150
TEMED ( $\mu$ l)	15

*Tabla 14. Reactivos para gel concentrador de tricina SDS-PAGE 4%*

<b>Gel concentrador</b>	<b>4% (4 geles)</b>
AB-3 (ml)	1.0
Buffer de gel (ml)	3.0
Volumen final (ml)	12.0
APS ( $\mu$ l)	90.0
TEMED ( $\mu$ l)	9.0

El buffer de cátodo (anexo 3) se cargó en la parte interior de la cámara, y el buffer de ánodo (anexo 3) se colocó en la parte exterior, los geles se corrieron durante 53 minutos a 200 V. Después fueron teñidos en azul de Coomassie por 15 minutos y enjuagados por 30 minutos con agua en agitación. Finalmente, se realizó un cambio de agua y se dejó enjuagando en agitación overnight, para su posterior digitalización en el transiluminador utilizando pantalla para luz blanca.

## **5.12 Procesamiento de muestras inducidas en 10 mL**

Se sembraron colonias en medio LB y se indujeron con IPTG a las 4 horas, posteriormente se cosechó la biomasa centrifugando a 4500 rpm por 15 minutos. Se resuspendió la biomasa en 1 ml de buffer de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 200 mM), agregando 5  $\mu\text{l}$  de PMSF 200 mM. Se sonicaron las muestras en pulsos de 15 segundos, con descansos de 30 segundos en hielo y se tomó una alícuota para tener una muestra de fracción total. Posteriormente, para separar las fracciones soluble e insoluble se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos, se recolectó el sobrenadante (fracción soluble) y se resuspendió la biomasa en 1 ml de buffer de lisis, agregando 5  $\mu\text{l}$  de PMSF 200 mM.

Se prepararon las muestras (solubilizar en SDS) calentando a 65°C por 5 minutos, agregando buffer de corrida 4X (Tris-HCl 200 mM pH 6.8; SDS 4%; Glicerol 40%; Azul de bromofenol 0,02%;  $\beta$ -mercaptoetanol 12%) en una proporción 1:4. Se centrifugaron a 10,000 rpm por dos minutos.

### **5.12.1 Procesamiento de muestras de espacio periplasmático**

Se preparó 100 mM Tris HCl a pH 8.0 y 100 mM Tris HCl, 0.75% DOC. Se cosechó la biomasa y se resuspendió el pellet en la solución de Tris HCl pH 8.0, adicionando 100 mM Tris HCl 0.75% DOC, para obtener una concentración de DOC de 0.15%. Se incubaron las muestras 7 horas a 22°C en agitación, se centrifugaron las muestras 10 minutos a 16,000 x g. Se tomó una alícuota de 2 ml de medio LB del que se recuperó la biomasa, se congeló en nitrógeno líquido y se concentró por 1 hora en el SpeedVac a temperatura baja. Se analizaron el sobrenadante, la pastilla y el medio en tricina-SDS-PAGE 16%.

## **5.13 Lavado de Cuerpos de Inclusión (1 L)**

Se sembró un matraz semilla con 60 ml de medio LB inoculado con 3 mL de la cepa de interés, el cual fue incubado por 3 horas a 37°C y 225 rpm. Posteriormente, se

inoculó 1 L de medio LB con kanamicina en un matraz de 2 litros utilizando 20 ml del matraz semilla, se incubó el matraz a 37°C y 180 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica entre 0.6 y 0.8, para posteriormente inducir con IPTG 1 mM y se incubó por 16 horas a 16°C y 180 rpm.

Se recuperó la biomasa en 2 botes de 250 ml, centrifugando 15 minutos a 10,000 rpm, repitiendo hasta cubrir todo el volumen (se cargaron 200 ml en los botes cada vez), se tomó una muestra de 10 mL del matraz para analizar mediante SDS-PAGE. Se traspasó la biomasa a un tubo Falcon de 50 ml (previamente pesado) utilizando PBS 1X para resuspender y se centrifugó por 5 minutos retirando el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron las pastillas en 3 ml de solución NaCl 50 mM. Se recuperó lo restante con 6 ml de NaCl 50 mM (solución de Lavado 1) y se traspasó a un contenedor con el tamaño adecuado para el sonicador, posteriormente, se realizaron 5 ciclos de 20 s de sonicación y 40 s de descanso, al terminar se dejó reposar la muestra por 5 minutos en hielo. Se realizó un segundo ciclo de sonicación (5 min: 20s, 40 s). Para centrifugar, se llevó la muestra a 25 ml y se utilizó un contrapeso con agua para centrifugar 15 minutos a 7000 rpm. Se retiró el sobrenadante con la pipeta y se resuspendió en 15 ml NaCl 50 mM, 0.1% Tritón (solución de lavado 2) utilizando el homogeneizador. A las células resuspendidas se realizaron 5 ciclos de 20 s sonicación y 40 s de descanso, se dejó reposar 5 minutos en hielo y se repitió el proceso de sonicación. Se centrifugaron 15 minutos a 7000 rpm, hasta que se pudieron ver tres colores en la pastilla: blanco, café y gris. El blanco son bacterias sin lisar, el gris es producto del contacto con el metal y el desgaste del sonicador, y el café son los cuerpos de inclusión. Se repitió el proceso con la solución de lavado 2 hasta que únicamente quedaron café y gris en la pastilla. Una vez que se obtuvieron los cuerpos de inclusión, se solubilizaron en urea 8M (se sugiere si se planea purificar mediante FPLC, se solubilice en el buffer de unión).

**Nota:** para el escalamiento de Lemo21 (DE3) se agregaron 10 µg de lisozima y 10 µl de EDTA 5 M a la solución de lavado 1 para facilitar la ruptura celular, dejando incubar 10 minutos.

## 5.14 Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

Después de procesar las muestras como se describió previamente, se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se añadió 10  $\mu\text{L}$  de buffer de carga de proteínas 4X (tampón Tris-HCl 200 mM pH 6.8; SDS 4%; glicerol 40%; azul de bromofenol 0,02%;  $\beta$ -mercaptoetanol 12%), se incubaron las muestras a 65 °C por 10 min. Se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra en dos geles de tricina SDS-PAGE 16% (un gel se teñirá con azul de Coomassie y el otro se utilizará para transferir) y 2  $\mu\text{L}$  de marcador Benchmark Marker (en el gel para Coomassie) o 3  $\mu\text{L}$  de Broad Range Protein NEB (en el gel para Western Blot). Se corrió a 200 V por 50 minutos en buffer de cátodo y buffer de ánodo 1X nuevo. El gel elaborado para tinción con Coomassie se transfirió a una caja de Petri y se incubó en solución de teñido (metanol 40%, ácido acético 10% y azul de Coomassie R-250 0,123%) toda la noche, posteriormente, se retiró la solución de teñido y se realizaron 2-3 lavados del gel en agua durante 30 min cada lavado. Posteriormente, se digitalizó el gel.

Para realizar la transferencia a membrana de PVDF, previamente se colocó una unidad de enfriamiento azul a -20°C y se recortó la membrana de PVDF (9x7 cm), posteriormente, la membrana fue activada durante 5 minutos en metanol absoluto.

Se armó el cassette de transferencia colocando cada componente en el siguiente orden: base del cassette (lado negro), esponja, papel filtro, gel de acrilamida, membrana activada, papel filtro, esponja y tapa del cassette (lado transparente). El cassette armado se colocó en la cámara de transferencia (la tapa negra debe coincidir con el lado negro de la cámara y la tapa transparente con el rojo) y la unidad de enfriamiento. Se llenó la cámara con buffer de transferencia (metanol 20%, glicina 200 mM, Tris Base 25 mM) nuevo y se realizó la transferencia a 30 V a 4°C toda la noche. Para realizar el bloqueo de la membrana, se colocó en un recipiente adecuado y se incubó en solución de bloqueo (TBS 1X + Tween 20 0.05% + leche descremada 5%) por 2 h. Después se efectuaron tres lavados con solución de lavado (TBS 1X + Tween 20 0.05%) por 5 minutos cada uno.

Para anticuerpos primarios no acoplados, se añadió a la membrana el anticuerpo primario (Mouse anti-His, Invitrogen CAT# 37-2900 LOT 630192A) en solución de bloqueo a una dilución 1:1000 y se incubó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó la membrana con solución de lavado 10 veces por 5 min cada lavado. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario (Anti-Mouse IgG rb, A9044-2ml Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in rabbit, Invitrogen), acoplado a HRP, en solución de bloqueo a una dilución 1:10000. Se incubó 6 horas a 4°C y agitación, finalmente se efectuaron 12 lavados con TBS-Tween por 5 minutos cada lavado.

Para el revelado de la membrana se utilizó el sistema comercial Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL). Se realizaron alícuotas por separado de 750 µL de cada solución de reacción enzimática (A y B), se mezclaron 750 µL de cada solución de reacción enzimática, teniendo así un volumen final de 1.5 mL (Solución A+B). Se removió la solución de lavado en exceso de la membrana y se colocó la mezcla de solución A+B sobre ésta, después se dejó actuar por 3 min, secando un poco la membrana, escurriéndola en servilletas. Se limpió la cámara de revelado con agua destilada, se colocó la membrana justo debajo de la regla y entre los dos plásticos, se colocó película de revelado en oscuridad se dejó reaccionar en lapsos de 30 segundos, revisando cada 5 segundos, observando si había bandas, se enjuagó con ddH<sub>2</sub>O y se colocó en fijador por 20 s, enjuagando con ddH<sub>2</sub>O.

### 5.15 Ensamblaje *in vivo* (*In vivo assembly*)

Se diseñaron los oligonucleótidos con la modificación deseada (cambiando el inicio de la secuencia del gen sintético de ATGGGG a ATGTTA y evitar la formación de una estructura secundaria) para que amplificaran el vector completo.

Tabla 15. Oligonucleótidos diseñados para ensamblaje *in vivo*.

Sentido	Nombre de oligonucleótido	Secuencia
Forward	pCri-8a-IVA-hEGF-F	TCCAGGGCGCCATGTTAAACTCTGACTCA
Reverse	pCri-8a-IVA-hEGF-R	TAACATGGCGCCCTGGAAGTAAAGGTTTT

Se diluyeron los plásmidos que se iban a modificar para que quedaran a una concentración de 10ng/ $\mu$ l y se amplificó el fragmento con Phusion DNA Polimerasa en reacciones de 25  $\mu$ L de volumen total. Se probó un gradiente de temperatura (50, 55 y 60°C).

Tabla 16. Mezcla para ensamblaje *in vivo*.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O	15.75
Buffer 5X	5.00
dNTPs (2.5 mM)	0.50
Oligonucleótido F	1.25
Oligonucleótido R	1.25
Phusion pol	0.25
DNA (<10 ng/ $\mu$ L)	1.00

Tabla 17. Ciclos de temperatura para ensamblaje *in vivo*.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
98 °C	30 s
98 °C	10 s
Tm	30 s
72 °C	4 min (18x)
72°C	10 min

Para confirmar el ensamblaje se corrieron 5  $\mu$ L del producto de PCR en un gel de electroforesis y, en función de la intensidad de la banda, se seleccionó una de las reacciones; posteriormente, se tomaron 15  $\mu$ L de producto de PCR y se añadieron 2  $\mu$ L de buffer CutSmart, 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ L de DpnI. Finalmente, se incubó 30 min a temperatura ambiente y se transformaron células competentes de *E. coli*.

## **5.16 Replegamiento del factor de crecimiento epidérmico**

Se utilizaron tubos Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filters Ultracel®-3K, Regenerated Cellulose 3,000 NMWL, Merck Milipore. Se preparó 1 L de buffer de replegamiento (20 mM Tris Cl pH 8.5, 100 mM NaCl 100 mM Sacarosa, 2 mM L-glutati3n reducido [GSH], 0.2 mM L-glutati3n oxidado [GSSG]) y, posteriormente, se filtr3 con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ .

La primera vez que se utiliz3 el tubo Amicon® Ultra-15 se realizaron lavados con agua milli-Q y etanol 70%. Ambos lavados se realizaron a 3500 rpm por 20 minutos y 50 min, respectivamente. Primero se tomaron 4 ml de la fracci3n purificada y se colocaron en un tubo Amicon® con un filtro de m3ximo la mitad del peso molecular de la prote3na de inter3s (en este caso se utiliz3 el de 3 KDa), tambi3n se adicionaron al Amicon® 8 ml de buffer de replegamiento quedando en una proporci3n 1:4 de la muestra. Despu3s se centrifugaron a 3500 rpm durante 1 hora a 4°C, se recuper3 el filtrado para su posterior an3lisis mediante SDS-PAGE, posteriormente, se volvi3 a llevar el volumen a 12 ml con buffer de replegamiento (se recomienda enjuagar un poco el filtro, pipeteando de manera paralela a las paredes) y se centrifug3 a 3500 rpm y 4°C por 1 hora recuperando el filtrado, este proceso se repiti3 por cuadruplicado.

A continuaci3n, se llev3 el volumen a 12 ml utilizando Tris-Cl pH 7.4 y se centrifug3 5 veces a 4°C y 3500 rpm durante 1 hora, volviendo a llevar el volumen a 12 ml y recuperando el filtrado en cada repetic3n. Despu3s se lav3 la columna 1 hora en agua milli-Q y posteriormente en Etanol 70%, ambos a 3500 rpm y 4°C. Una vez terminadas las repeticiones, se almacen3 la muestra a 4°C para su posterior an3lisis mediante SDS-PAGE y cuantificaci3n.

## **5.17 Ensayo de Bradford Quick Start (Biorad)**

El ensayo se realiz3 en formatos diferentes de microplaca de 250  $\mu\text{l}$ , utilizando BSA, el cual tiene un rango de 125 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

Se empez3 aclimatando a temperatura ambiente el reactivo de Bradford, agitando suavemente. Se procedi3 a preparar la curva tipo para BSA, como diluyente se utilizaron



Tris 50 mM pH 7.4 y PBS, las concentraciones se encuentran en el anexo 5. Se pipetearon 5  $\mu$ l de cada muestra en los pozos de la microplaca, haciendo un triplicado para cada muestra y cada estándar, posteriormente se agregaron 250  $\mu$ l de reactivo de Bradford 1x. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, se midió la absorbancia a 595 nm y se restó el valor del blanco a los valores estándares y a las muestras, para después graficar los valores de absorbancia en el eje y, mientras que las concentraciones van en el eje x.

## **5.18 Cultivo de fibroblastos**

Para comprobar la actividad biológica de EGF, se utilizó el sexto pase de la línea celular GM03440 del Corell Institute, correspondiente a fibroblastos humanos extraídos de la pierna de un adulto joven sano de 20 años.

**Nota:** todo el trabajo se realiza en la campana de flujo

### **5.18.1 Descongelamiento de línea celular**

Se extrajo un vial de  $-80^{\circ}\text{C}$  y se colocó en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, se diluyó el contenido del vial en un tubo cónico de 15 o 50 ml, utilizando una proporción 1:6 en medio completo (MEM + PenStrep 1X + Piruvato 1 mM + 15% SFB). Inmediatamente, se centrifugó durante 4 minutos a 1200 rpm, decantando y reemplazando el medio con 5 ml de medio completo, se resuspendió la pastilla cuidadosamente. Posteriormente se traspasó la dilución celular a una botella de cultivo y se dejó incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Se monitoreó la confluencia en un microscopio invertido cada 24 horas, hasta alcanzar una confluencia de alrededor del 90%.

### **5.18.2 Ensayo de proliferación MTT con hEGF**

Después de haber alcanzado una confluencia del 90% en la botella o caja, se retiró el medio, se realizaron dos lavados con 4 ml de PBS 1X pH 7.4, únicamente adicionando

con la pipeta y decantando, inmediatamente se agregaron 2 ml de tripsina-EDTA 0.25% a la botella. Se retiró la mayor parte de la tripsina y se agregaron 2 ml de medio completo para inactivar. Para desprender las células la botella se invirtió suavemente la botella y, esporádicamente, se colocaba de manera vertical dando golpes suaves a la caja, mientras se hacía esto se podía ver una sustancia viscosa recorriendo la pared de la botella, se continuó invirtiendo hasta que la sustancia viscosa descendió hasta el fondo de la botella. Se traspasó la solución celular a un microtubo de 1.5 mL, posteriormente, se tomó una alícuota y se hizo una dilución 1:2 en medio completo, con esta suspensión celular se preparó una mezcla 1 a 1 con azul de tripano para cargar 10 µl en un cartucho del contador automático Countess. Con el conteo anterior se hicieron los cálculos para diluir y obtener una suspensión celular de entre  $2 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  células/ml.

En una placa de 96 pozos se cargaron los pozos suficientes para tener un triplicado de cada tratamiento con la suspensión celular y se dejaron incubar a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Una vez pasado el periodo de incubación se prepararon las diluciones con las diferentes concentraciones de hEGF, empezando por tener un stock de hEGF recombinante y comercial en una concentración de 500 ng/ml para posteriormente hacer diluciones 1:10 en MEM, se prepararon 400 µl de cada dilución (para obtener una mejor homogenización en las concentraciones se utilizó el vórtex por 5 s seguido de un spin en la microcentrífuga para cada muestra).

*Tabla 18.* Concentraciones de hEGF recombinante y comercial para el ensayo MTT.

<b>pCri-8a IVA hEGF</b>		<b>Sigma Aldrich</b>	
50	ng/ml	50	ng/ml
5	ng/ml	5	ng/ml
0.5	ng/ml	0.5	ng/ml
0.05	ng/ml	0.05	ng/ml
0.005	ng/ml	0.005	ng/ml

Una vez preparadas las diluciones, se retiró el medio de cultivo de los pozos utilizando una pipeta multicanal, después se llenaron los pozos, sirviendo 100  $\mu$ l de la dilución correspondiente, haciendo un triplicado para cada dilución y se dejó incubar por 48 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Se prepararon 1.5 ml de MTT (5 mg/ml), una vez preparado, se filtró en membranas de 0.25  $\mu$ m y se mantuvo en oscuridad, para posteriormente diluir el MTT en Buffer Krebs Ringer Bicarbonato para una dilución 1:10. Se retiró el medio con la pipeta multicanal, posteriormente, se realizó un lavado con 100  $\mu$ l de PBS 1X pH 7.4 para retirar el medio con colorante (en caso de que sobre medio, se puede hacer un segundo lavado con PBS) y se agregaron 100  $\mu$ l de Krebs Buffer-MTT a cada pozo utilizando la micropipeta multicanal y se incubó en oscuridad por 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

A continuación, con la micropipeta multicanal se retiraron 75  $\mu$ l de Krebs Buffer-MTT a todos los pozos y se agregaron 50  $\mu$ l de DMSO a cada pozo, la placa se incubó durante 10 minutos en oscuridad a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y finalmente se leyó la absorbancia a 540 nm y 570 nm.

#### **5.19. Producción de hEGF en fermentador aerobio de tanque agitado**

Se realizó un preinóculo en 2 mL de medio LB+Kn+Cl de *E. coli* Lemo21(DE3) transformada con el vector pCri-8a-hEGF-IVA, se incubó por 16 horas a 37°C, posteriormente, se inóculo un matraz de 50 mL con el preinóculo, que también se incubó por 16 horas a 37°C.

Se utilizó el fermentador y biorreactor Eppendorf New Brunswick BioFlo®/CelliGen® 115 Benchtop con un tanque de 15 L y turbinas tipo Rushton (el ensamblado se describe en el anexo 7), después de calibrar los sensores, se prepararon 4 L de medio en el reactor y se esterilizó. Se inculó el reactor con el preinóculo de 34 mL, se agregaron 800  $\mu$ L de L-ramnosa 500 mM para obtener una concentración de L-ramnosa 100  $\mu$ M y se mantuvo el cultivo a 37°C utilizando la cascada de oxígeno para controlar la agitación, hasta que la densidad óptica del cultivo fuera de 0.8. Una vez

obtenida la densidad óptica se indujo con 4 mL de IPTG 1 M y se bajó la temperatura a 30°C.

Se recolectaron muestras a las 0 h, 1 h, 2h, 4 h, 6 h y 21 horas después de la inducción con IPTG, recolectando toda la biomasa en el último punto.

## 6. Discusión y Resultados

### 6.1 Ensamblaje *in vitro*

Debido a que el EGF en su forma madura es una proteína de pequeño tamaño (53 aminoácidos), se optó por diseñar un gen sintético. Para el diseño del gen sintético, se utilizó la secuencia de aminoácidos P01133 de la base de datos Uniprot, perteneciente a EGF humano. De esta secuencia se obtuvieron los aminoácidos correspondientes al péptido maduro y se realizó optimización de codones para *E. coli* en la plataforma IDT ([www.idt.com](http://www.idt.com)), agregando secuencias que codifican para los codones de inicio y paro, así como sitios de restricción para las enzimas NcoI y HindIII.

Posteriormente, se buscó la secuencia con codones optimizados en la cual la estructura secundaria tuviera la menor energía libre de Gibbs utilizando la herramienta vector builder (<https://en.vectorbuilder.com/tool/dna-secondary-structure.html>).

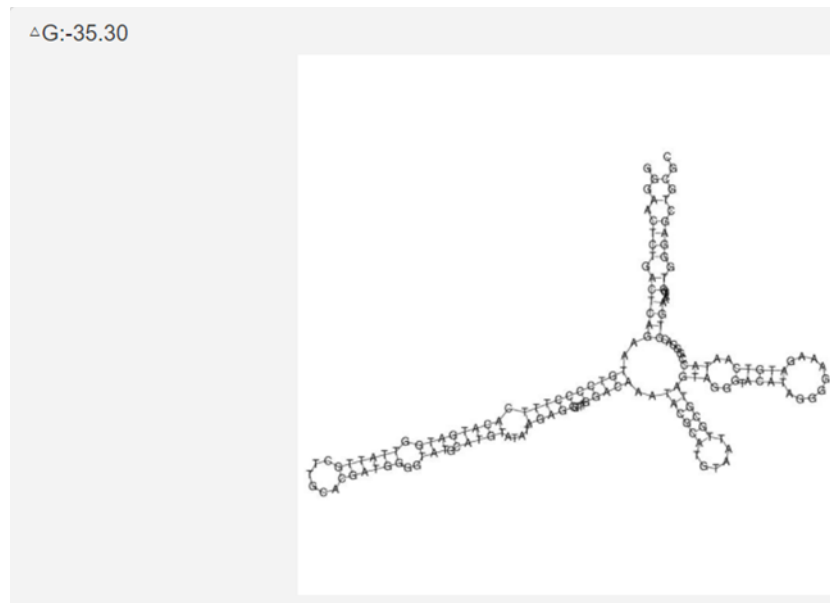


Figura 2. Estructura secundaria del gen sintético

Una vez identificada la mejor secuencia, se diseñaron dos oligonucleótidos de 99 y 100 pares de bases, con 23 pares de bases complementarias entre sí, para poder realizar la técnica de ensamblaje *in vitro*.

### Oligo Forward

CCATGGGGAACTCTGACTCAGAATGTCCCCTTTCACATGATGGTTATTGCTTGCACGATGGGGTATGCATGTA  
TATAGAGGCTTTGGACAAATACGCAT

### Oligo Reverse

AAGCTTTTAGCGCAGCTCCCACCATTTTCAGGTCCCGGTATTGACATCTTTCCCCTATGTACCCTACTACGCAA  
TTACATGCGTATTTGTCCAAAGCCTCT

Figura 3. Secuencia de los oligonucleótidos Forward y Reverse (en azul se muestra la región complementaria entre los oligonucleótidos). Se muestran en dirección 5'-3'.

Se realizó ensamblaje *in vitro* del EGF, realizando un gradiente de temperatura (55 °C, 60°C y 70°C), con el fin de encontrar la temperatura óptima. El gen sintético se ensambló en las tres temperaturas (Figura 4) y se decidió trabajar con 55°C.

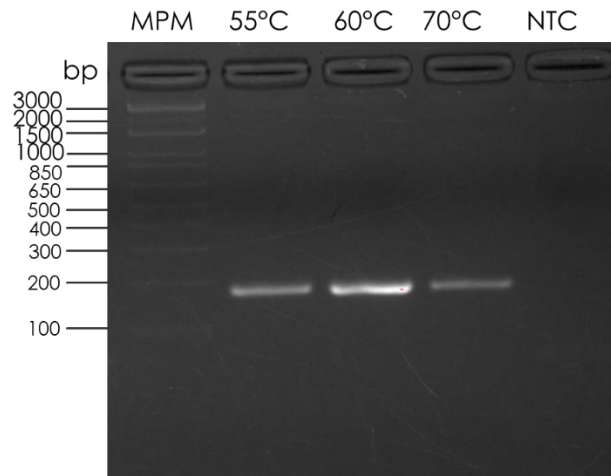


Figura 4. Ensamblaje *in vitro* de hEGF recombinante.

El gen ensamblado se insertó en el vector PCR-8/GW/TOPO mediante clonación TA, aprovechando los extremos 3'-Adenosina del producto de PCR generado por Taq polimerasa. Con la construcción anterior (PCR-8-hEGF) se transformó la cepa de mantenimiento de *E. coli* Mach1 T1 (Figura 4).



Para las colonias 2 y 3 no se encontraron diferencias con respecto al gen sintético, pero en la colonia 10 existía un cambio en el aminoácido 33 de Cys a Ser, por lo cual solo se continuó trabajando con las colonias 2 y 3 (Figura 6).

Se planteó trabajar con cuatro vectores de expresión: pCri-4a, pCri-8a, pCri-8b y pCri-12a (Tabla 19).

Tabla 19. Características de los vectores pCri con hEGF

Vector	Características con NcoI-HindIII	Resistencia a antibiótico	Tamaño (kpb)	Tamaño hEGF (KDa)
pCri-4a	His <sub>6</sub> -TRX-hEGF	Kanamicina	6.4	20.7
pCri-8a	His <sub>6</sub> -TEV-hEGF	Kanamicina	6.1	8.7
pCri-8b	hEGF	Kanamicina	6.1	6.4
pCri-12a	OmpA-hEGF-His <sub>6</sub> y coexpresión de DsbC	Ampicilina	5.2	8.4

Debido al uso de las enzimas de restricción NcoI y HindIII, se definió comenzar con la transformación en pCri-8b, ya que facilitaría la expresión de la proteína sin ningún tipo de fusión (Figura 7).

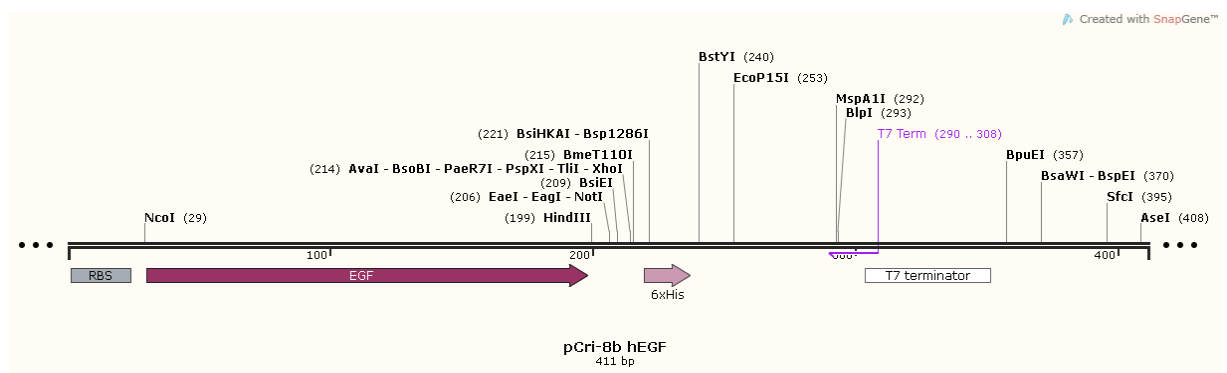


Figura 8. Representación esquemática del mapa del inserto hEGF en pCri-8b



Se realizaron digestiones con las enzimas NcoI y HindIII para extraer el gen sintético del plásmido PCR-8-hEGF de las colonias 2 y 3 de MACH1 T1, así como para linealizar el vector pCri-8b (Figura 8), retirando el gen EYFP integrado a los plásmidos pCri.

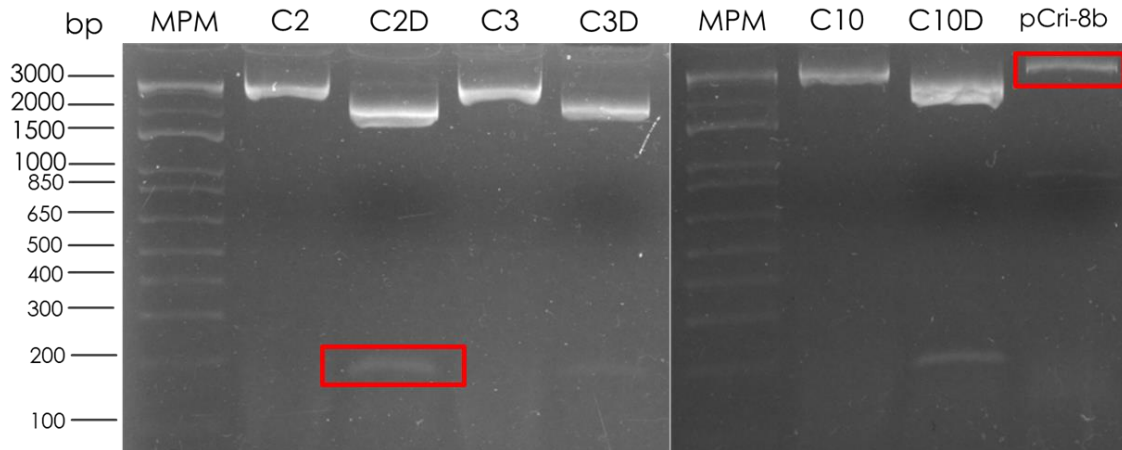


Figura 9. Digestión de los vectores pCR8-GW-TOPO-hEGF y pCri-8b con las enzimas NcoI y HindIII

Se corroboró la transformación mediante PCR de colonia y secuenciación para pCri-8b (Figura 9).

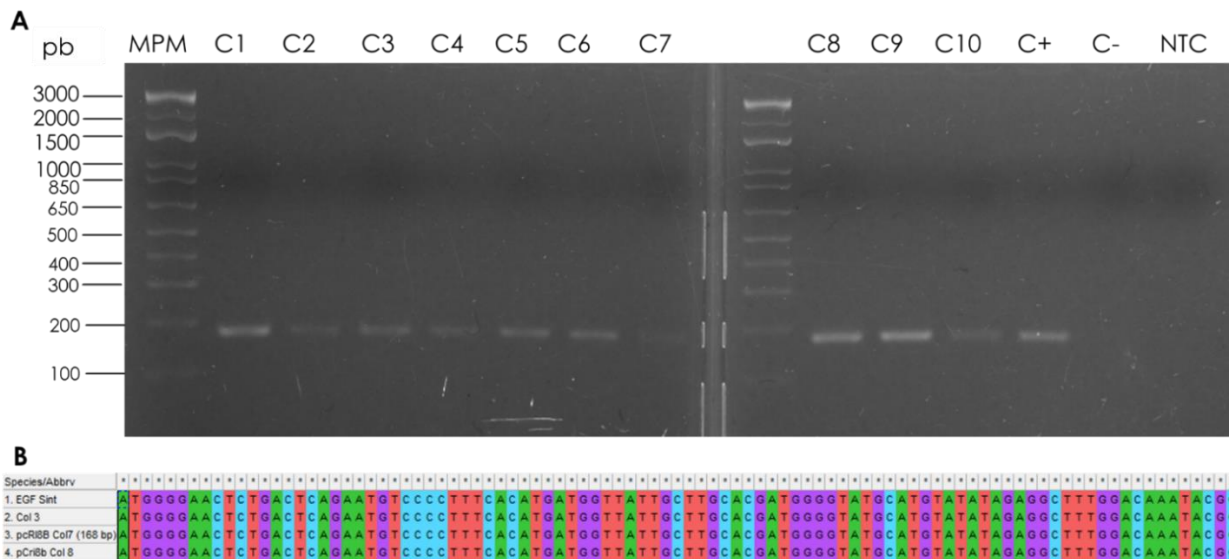


Figura 10. Confirmación de transformación del vector pCri-8b-hEGF en *E. coli* BL21 (DE3) mediante PCR de colonia (A) y secuenciación (B)

## 6.2 Expresión de hEGF en *E. coli* transformada con pCri-8b-hEGF.

De las colonias transformadas con pCri-8b-hEGF previamente secuenciadas, se sembraron las colonias 3 y 7 para evaluar la expresión de hEGF al inducir con IPTG 1 mM, procesando las muestras mediante sonicación y separación de fracciones solubles e insolubles, pero no se observaron bandas de expresión (Figura 11).

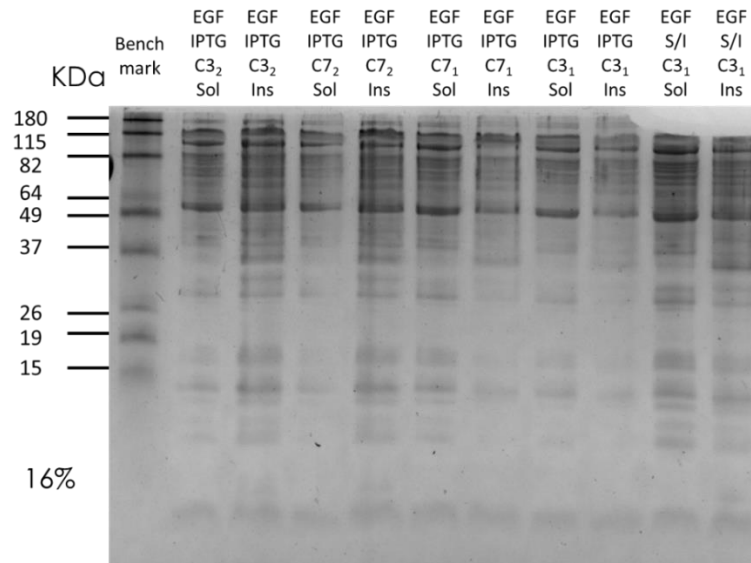


Figura 11. Inducción de *E. coli* BL21 (DE3) pCri-8b-hEGF con 1 mM IPTG

Para corroborar que no hubiera síntesis de escape, se adicionó glucosa a los controles no inducidos (Figura 11), no se observó una diferencia entre las bandas presentes con respecto a los controles no inducidos con glucosa.

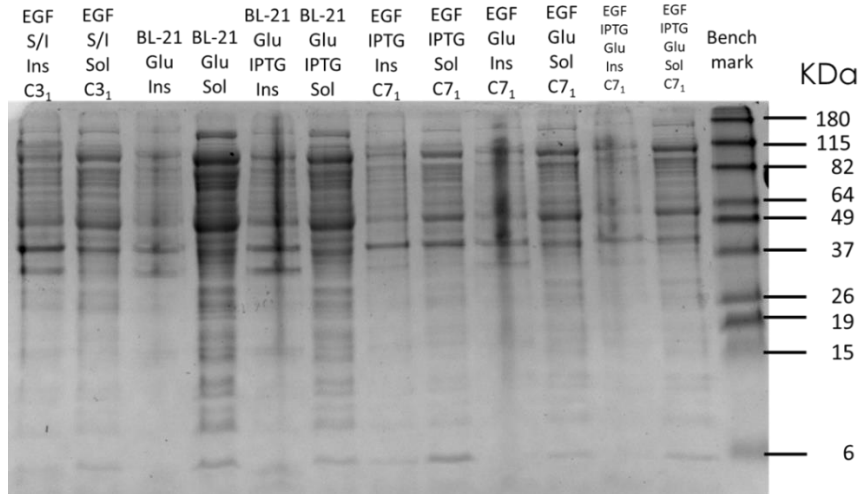


Figura 12. Inducción de las fracciones soluble e insoluble de las colonias 31, 71 y BL21 como control negativo.

Para descartar que hEGF estuviera siendo degradada por *E. coli* se realizó una cinética de expresión con muestras procesadas mediante sonicación y separación de fracciones solubles e insolubles, a las 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas de la inducción con IPTG (Figura 11).

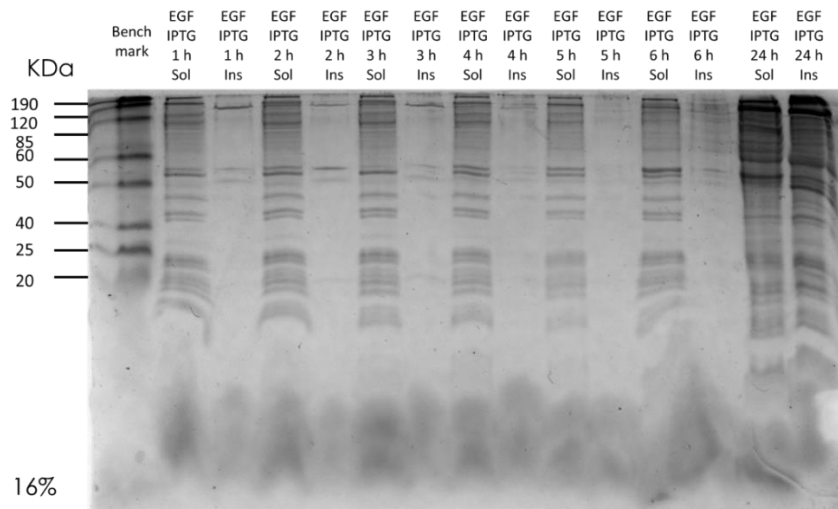


Figura 13. Cinética de inducción de *E. coli* BL21 (DE3) pCri-8b-hEGF con 1 mM IPTG

### 6.3 Clonación de hEGF en el plásmido pCri-8a

Para poder confirmar la expresión mediante inmunodetección por Western Blot, así como para facilitar la purificación, se insertó hEGF en el plásmido pCri-8a (Figura 14), en el cual posee un tag de seis histidinas con las enzimas NcoI y HindIII.

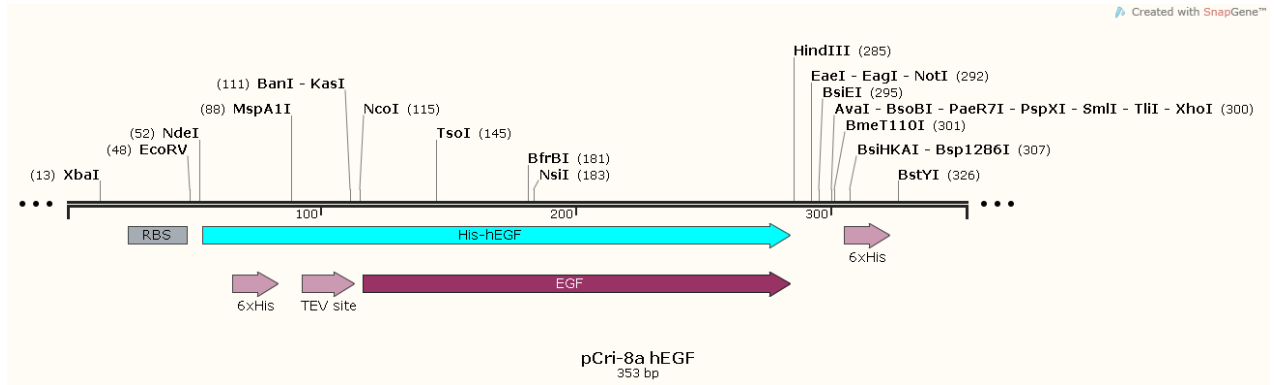


Figura 14. Representación esquemática del mapa del inserto hEGF en pCri-8a

Al realizar la digestión con NcoI y HindIII se observó el plásmido recombinante con el peso esperado (Figura 15).

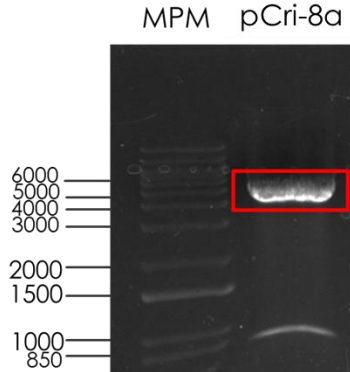


Figura 15. Digestión del plásmido pCri-8a con las enzimas NcoI y HindIII

Tras realizar la digestión, se realizó una ligación con pCri-8a y el gen hEGF sintético, para posteriormente transformar *E. coli* Mach1 T1. La transformación fue confirmada mediante PCR de colonia (Figura 16A), se seleccionaron las colonias 1, 8 y 9 para su posterior secuenciación, y se confirmó que la identidad de las tres colonias correspondía completamente al gen diseñado *in silico* (Figura 16B).

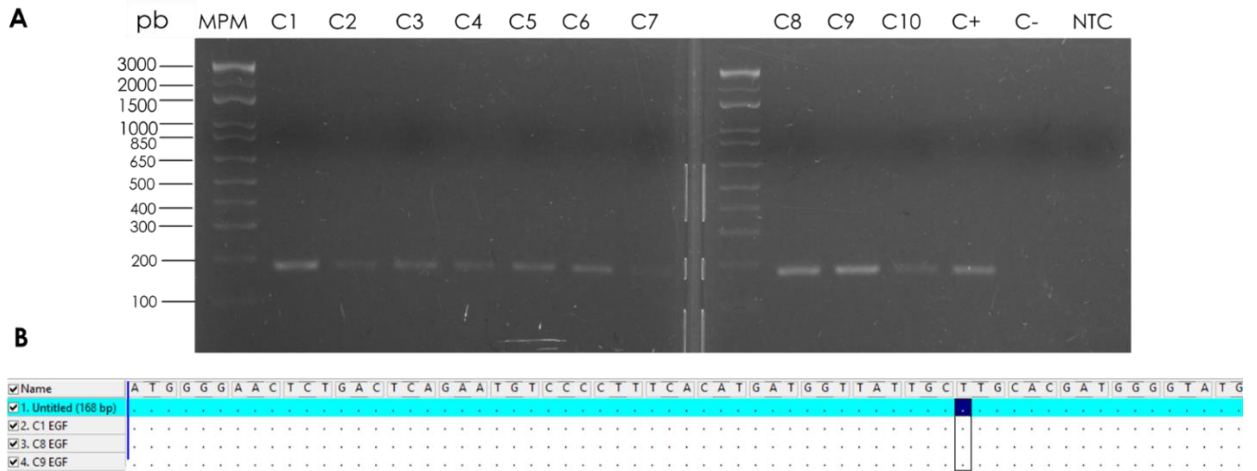


Figura 16. Confirmación de transformación del vector pCri-8a-hEGF en *E. coli* BL21 (DE3) mediante PCR de colonia (A) y secuenciación (B)

Se extrajo pCri-8a-hEGF y se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3), se verificó la transformación mediante PCR de colonia (Figura 17).

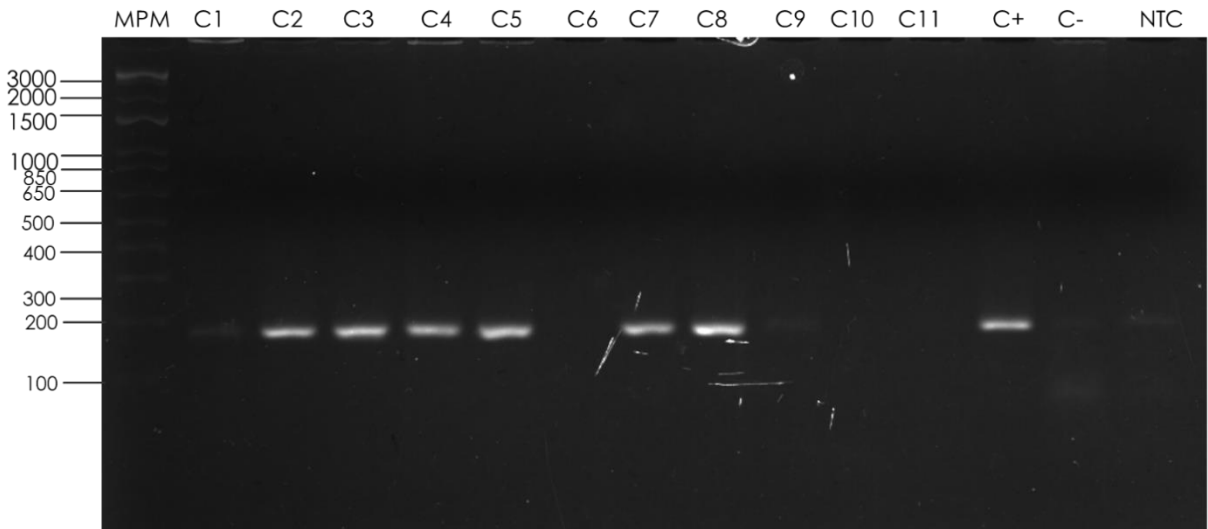


Figura 17. PCR de colonias para hEGF en el vector pCri-8a en *E. coli* BL21 (DE3).

## 6.4 Inducción de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pCri-8a

Para corroborar la expresión, se indujo con IPTG 1mM, se llevó a cabo lisis celular mediante sonicación y separación de las fracciones solubles (FS) e insolubles (FI), pero no se observaron bandas de expresión

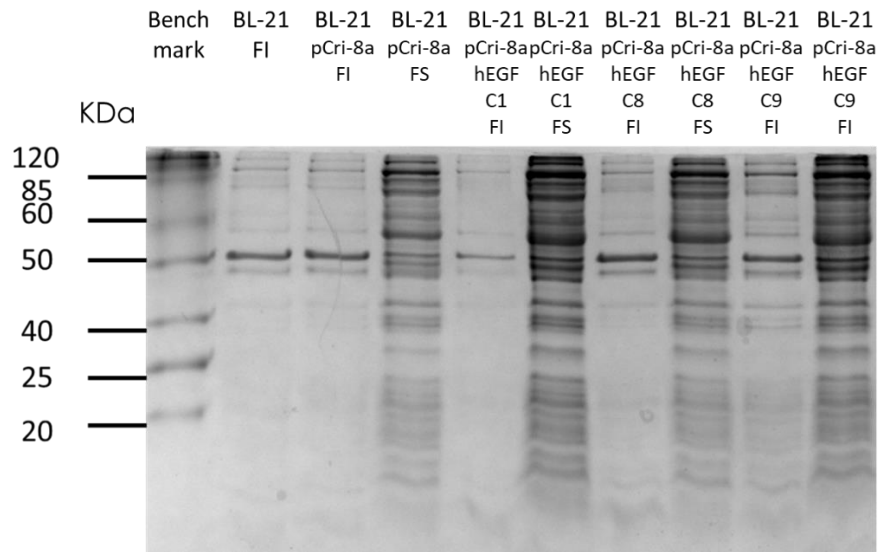


Figura 18. Inducción de *E. coli* BL21 (DE3) pCri-8a-hEGF con 1 mM IPTG

## 6.5 Clonación de hEGF en pCri-4a y pCri-12a

Tomando en cuenta que el EGF ha sido expresado fusionado a diferentes proteínas, así como a péptido señales, se comenzó a trabajar en los vectores pCri-4a y pCri-12a (Figura 19), el primero permitiendo una fusión a tioredoxina de *E. coli* y el segundo a una señal OmpA para transporte al espacio periplásmico (Oka et al, 1985; Su, 2006; Zheng, 2016).

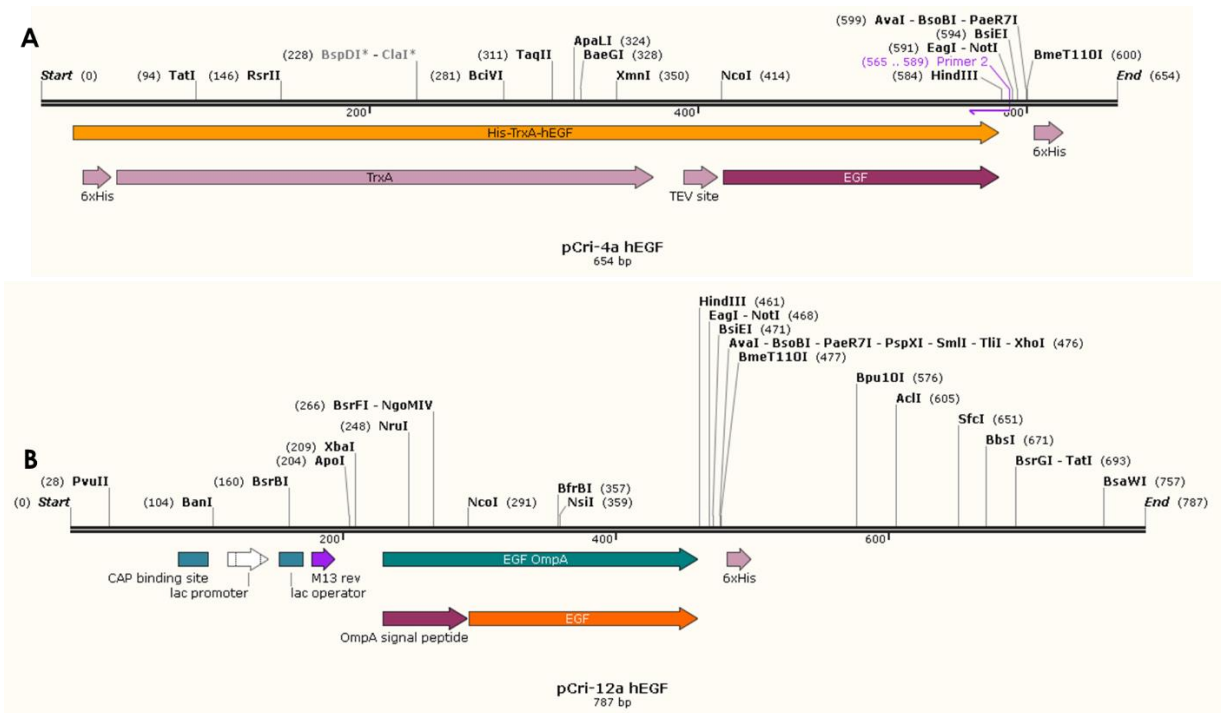


Figura 19. Representación esquemática del mapa del inserto hEGF en A) pCri-4a y B) pCri-12a

Se realizaron digestiones con *NcoI* y *HindIII* para linealizar los pCri-4a y pCri-12a, así como para obtener hEGF sintético a partir de PCR8/GW/TOPO-hEGF

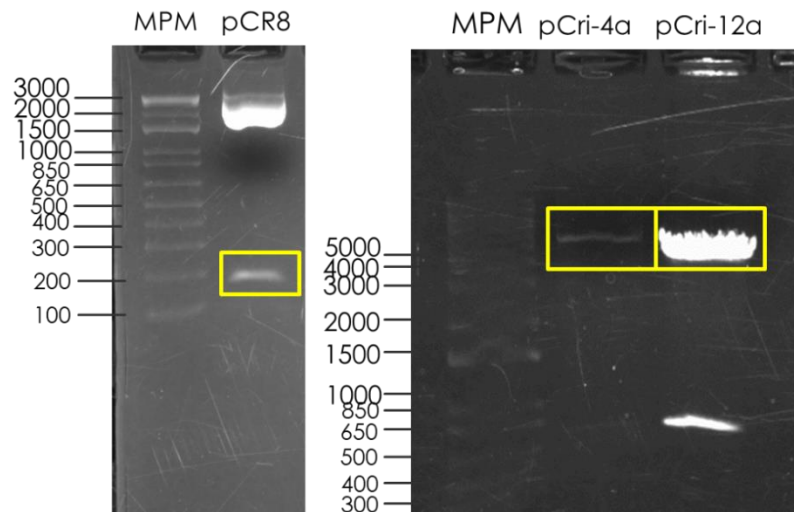


Figura 20. Digestión de pCR8/GW/TOPO-hEGF, pCri-4a y pCri-12a con las enzimas *NcoI* y *HindIII*







## 6.6 Inducción de *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos pCri-4a y pCri-12a

Se indujo con IPTG 1 mM una colonia transformada con cada vector, se procesaron las muestras para separar fracciones solubles e insolubles, y se corroboró la expresión mediante tricina-SDS-PAGE al 16%, utilizando BL21 (DE3) sin inducir como control.

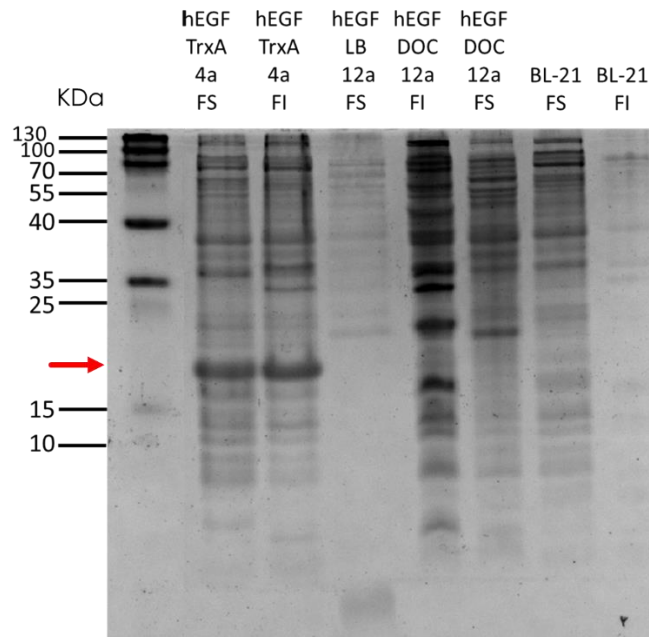


Figura 23. Inducción de *E. coli* BL21 (DE3) pCri-4a-hEGF y pCri-12a-hEGF con 1 mM IPTG

Como se observó una banda de expresión en el peso esperado (20.7 Kda) entre 15 y 25 Kda para pCri-4a-hEGF se confirmó la identidad mediante Western Blot utilizando un anticuerpo específico para His<sub>6</sub> (Figura 24), se obtuvo expresión tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble.

Otros autores han reportado la expresión con OmpA, pero en esos casos, hEGF se encontraba fusionada a una proteína FLAG, y se expresó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Además, generalmente se produce al EGF en vectores pET y no se ha reportado su expresión en los vectores pCri (Li et al, 2022; Maksum et al, 2022; Oka et al, 1985; Rhazis et al, 2007; Su et al, 2006; Zheng et al, 2016).

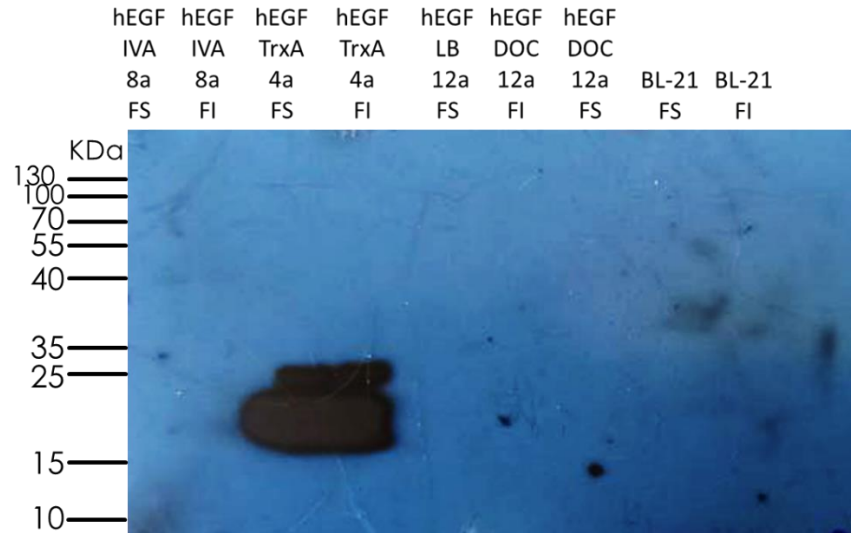


Figura 24. Comprobación de expresión de TrxA-hEGF mediante Western Blot

### 6.7 Producción y purificación de hEGF en matraz de dos litros

Se llevó la producción de TrxA-hEGF a 2 litros, sembrando dos matraces con 1 litro cada uno. Después de recuperar la biomasa, se realizó lisis mediante sonicación y se separaron fracciones solubles e insolubles para corroborar la expresión mediante tricina-SDS-PAGE al 16%. En ambos casos se observó la banda de expresión del tamaño esperado (Figura 25). Se obtuvieron 3.71 g de biomasa de 2 L de medio, obteniendo 1.855 g/L.

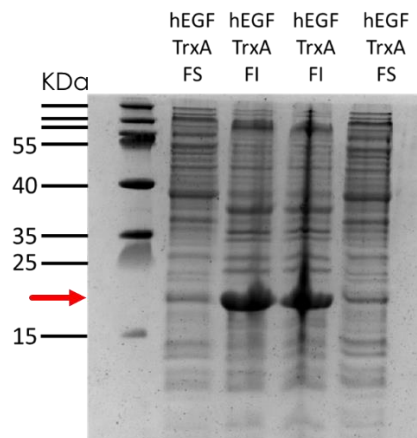


Figura 25. Inducción en 2 litros de *E. coli* BL21 (DE3) pCri-4a-hEGF

Se realizaron lavados de cuerpos de inclusión de la biomasa recuperada de los dos litros y los cuerpos recuperados fueron solubilizados en urea 8 M, se tomaron diferentes volúmenes de la muestra y se corrieron en tricina-SDS-PAGE al 16%.

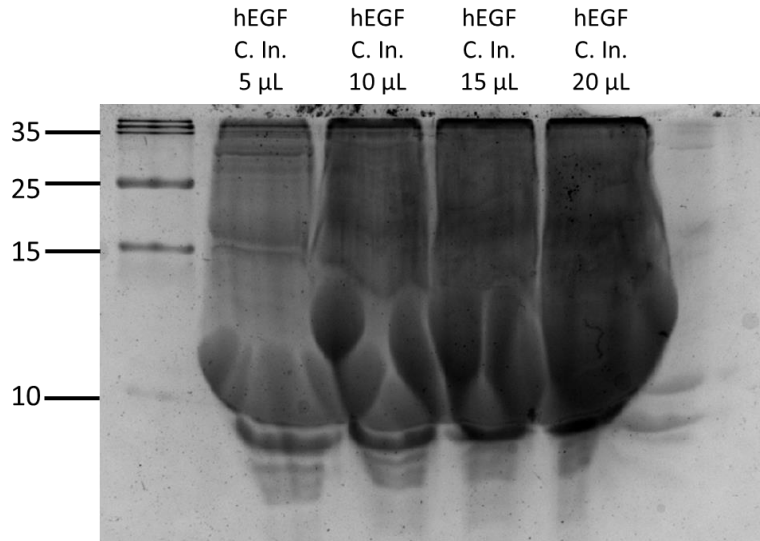


Figura 26. Cuerpos de inclusión solubilizados en urea 8 M

Los cuerpos de inclusión solubilizados se purificaron mediante FPLC por afinidad a níquel haciendo uso del tag de histidinas en TrxA-hEGF, realizando un gradiente de concentración de imidazol (Figura 27).



Figura 27. Cromatograma de la purificación de TrxA-hEGF mediante FPLC por afinidad a níquel

## 6.8 Mutagénesis dirigida mediante ensamblaje *in vivo*

Aunque se logró expresar y purificar el hEGF recombinante fusionado a tioredoxina, se decidió explorar más alternativas para la producción únicamente con un tag de histidinas.

Al volver a analizar la secuencia del gen sintético se detectó una región rica en guaninas al inicio de la secuencia (ATGGGG), por lo cual se decidió realizar mutagénesis dirigida mediante Clonación *in vivo*, método en el cual se pueden realizar inserciones, deleciones o mutagénesis dirigidas a un plásmido completo mediante el diseño de oligonucleótidos con un fragmento complementario entre sí de alrededor de 20 pares de bases (García-Nafría et al, 2016), modificando el codón inmediato al codón de inicio (Figura 28). Considerando que el aminoácido tuviera las mismas características fisicoquímicas, se cambió de glicina a leucina, ya que ambos son aminoácidos no polares y la secuencia utilizada para leucina no contiene guaninas.

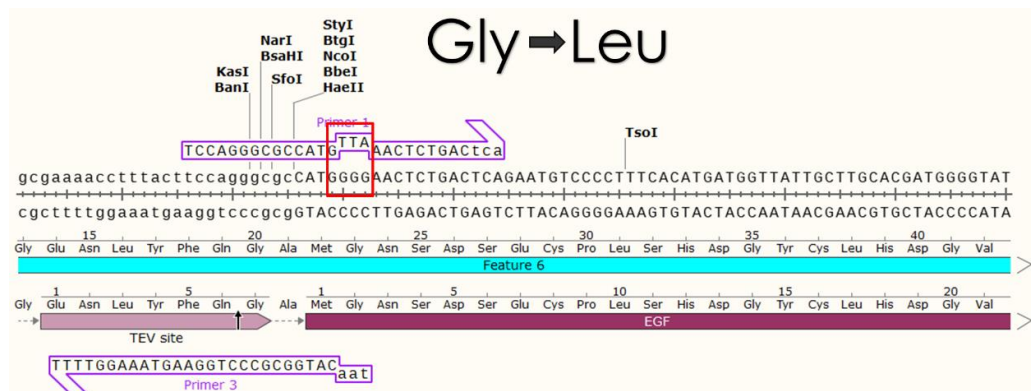


Figura 28. Diseño de oligonucleótidos para clonación *in vivo*. En rojo se señala la región rica en guaninas y la modificación en la secuencia pasando GGG a TTA

Se verificó la clonación *in vivo* realizando un gradiente de temperatura, observando su ensamblaje a 50, 55 y 60°C (Figura 29).



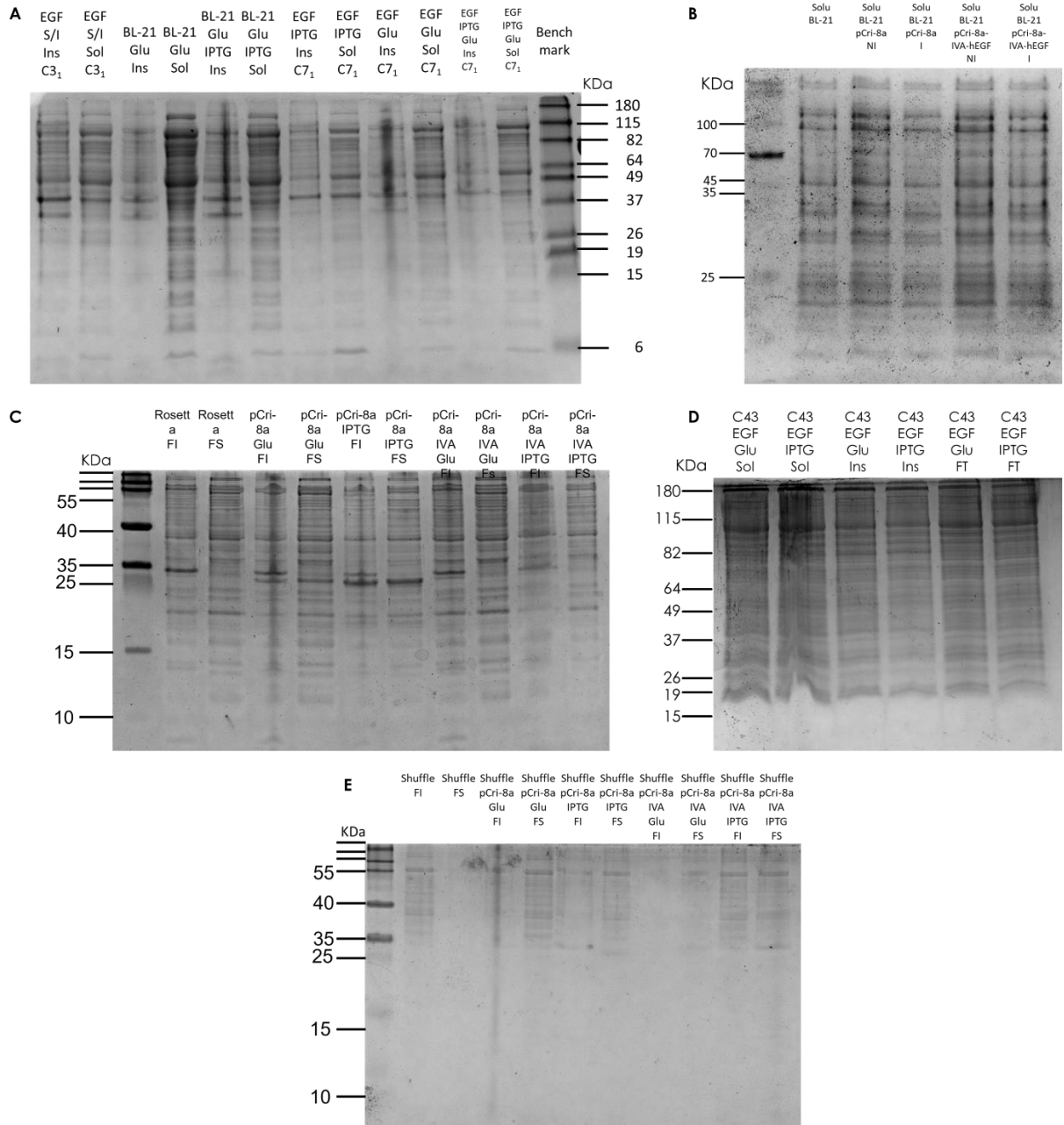


Figura 31. Inducción en diferentes cepas de *E. coli*. A. Inducción de BL21 (DE3); B. Inducción de SoluBL21; C. Inducción de Rosetta; D. Inducción de C43; E. Inducción de Shuffle

Para Lemo21(DE3) se realizó la inducción con IPTG 1 mM y diferentes concentraciones de L-rhamnosa (100, 500 y 2000  $\mu$ M), se observó una banda de expresión por debajo de los 15 KDa en las concentraciones inducidas con 100  $\mu$ M y 500  $\mu$ M (Figura 32).

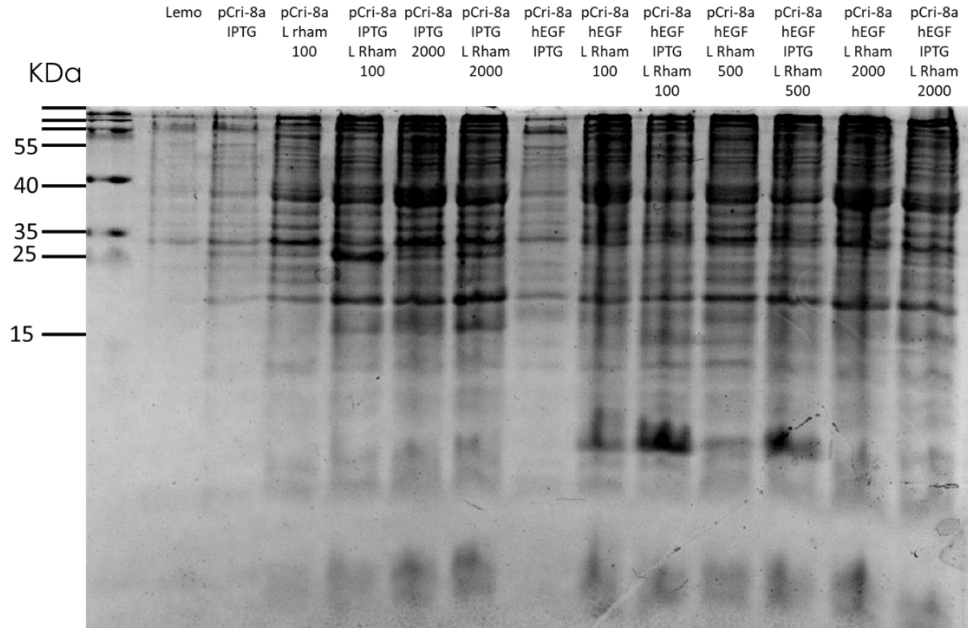


Figura 32. Inducción de *E. coli* Lemo21(DE3) con IPTG 1mM y L-Rhamnosa 100, 500 y 200  $\mu$ M

Se comprobó la identidad de hEGF mediante inmunodetección por Western Blot utilizando anticuerpo primario específico para His<sub>6</sub>, evaluando la expresión en la fracción total y fracción insoluble, utilizando como control TrxA-hEGF previamente purificada (Figura 33).

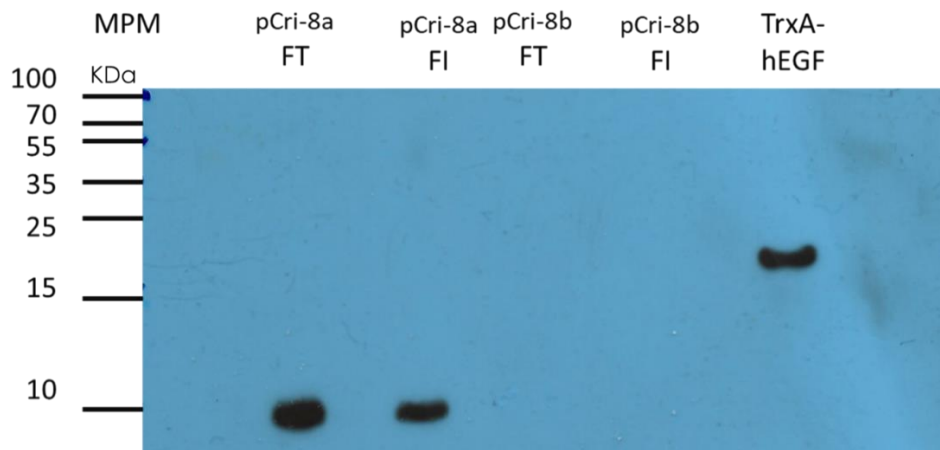


Figura 33. Inmunodetección de hEGF en *E. coli* Lemo21(DE3)



## 6.10 Producción y purificación de hEGF en matraz de dos litros

Una vez confirmada la expresión, se llevó la producción a 2 litros. Después de recuperar la biomasa, se separaron la fracción soluble e insoluble para confirmar la expresión de hEGF y únicamente se observó una banda de expresión en la fracción insoluble (Figura 34). Se obtuvieron 5.3354 g de biomasa del cultivo de 2 litros, obteniendo 2.677 g/L.

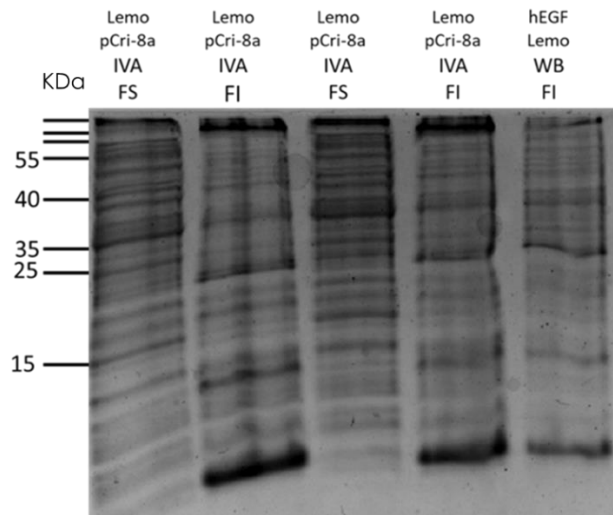


Figura 34. Inducción en 2 litros de *E. coli* Lemo21(DE3) pCri-8a-IVA-hEGF

Se realizaron lavados de cuerpos de inclusión, de los cuales se obtuvo 0.33465 g/L. Después de solubilizar en buffer de unión, se realizó la purificación del hEGF mediante FPLC por afinidad a níquel, realizando un gradiente de imidazol (Figura 35).



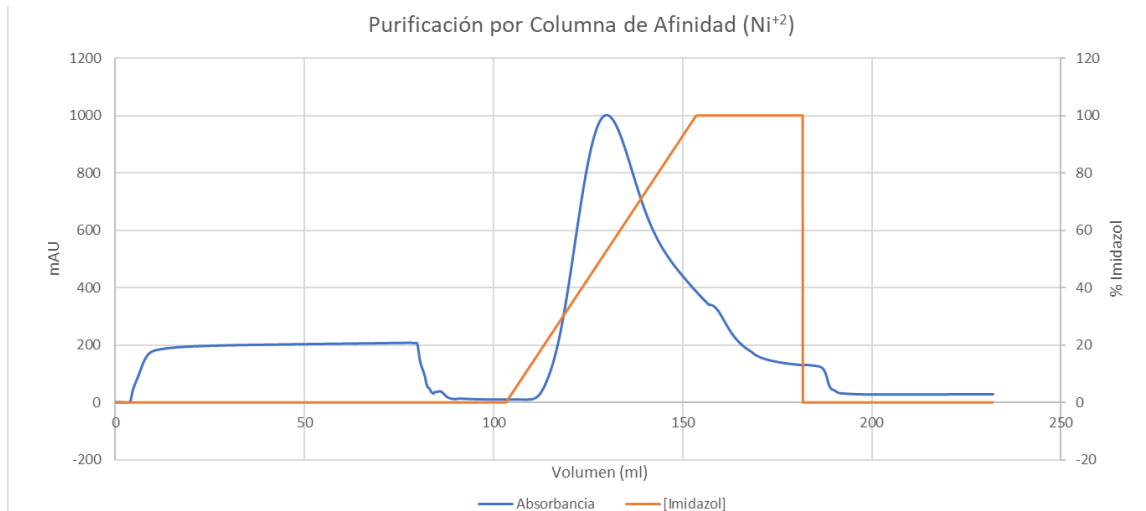


Figura 35. Cromatograma de la purificación de TrxA-hEGF mediante FPLC por afinidad a níquel

La purificación se corroboró mediante tricina-SDS-PAGE, cargando las fracciones obtenidas por FPLC (Figura 36).

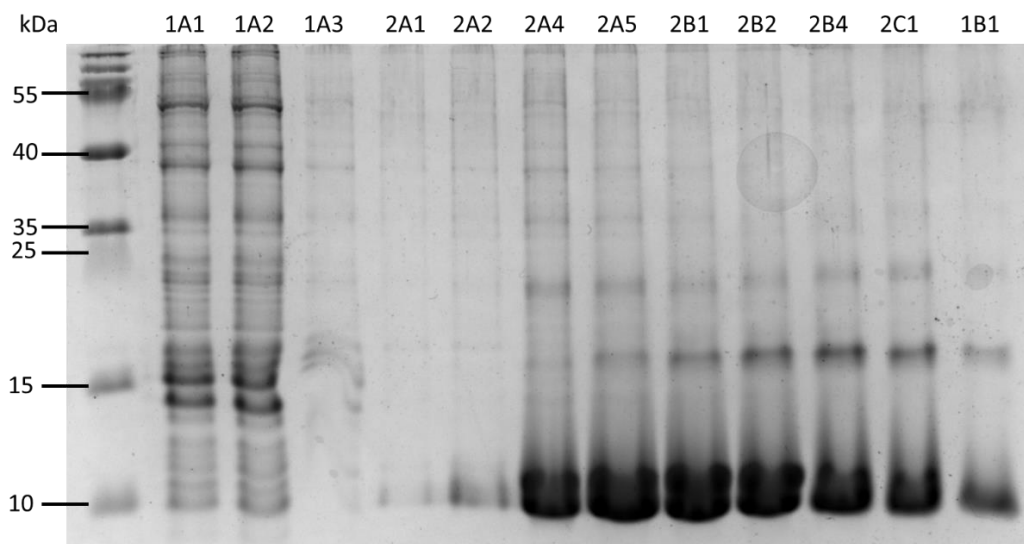


Figura 36. hEGF purificada por afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$

Al replegar hEGF purificado utilizando el método de Maksim se observaron dos bandas por debajo de los 25 KDa, pero ya no se observan las bandas correspondientes a dímeros o trímeros, lo cual podría indicar la existencia de configuraciones alternativas de hEGF (Figura 37).

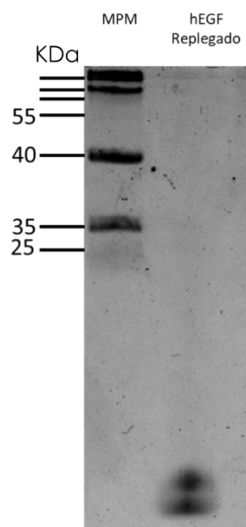


Figura 37. Replegamiento de hEGF purificado

Se realizó una curva estándar de BSA con el sistema comercial Bradford Quick Assay (Anexo 5) y, utilizando la ecuación 1, se obtuvo una concentración de 520.9167  $\mu\text{g/ml}$  de hEGF. Esta concentración es mayor a las reportadas por Oka (1985) en *E. coli* C600 de 2413  $\mu\text{g/L}$ , y Li (2022) en BL21(DE3) de 24  $\mu\text{g/mL}$ .

Ecuación 1. Ecuación de la recta para BSA en PBS 1X

$$y = 0.0004x + 0.0333$$

### 6.11 Ensayo de actividad biológica (ensayo de proliferación y viabilidad MTT)

Se sembraron fibroblastos humanos de la línea celular GM03440 en medio MEM (Minimum essential medium) y se dejaron crecer hasta obtener aproximadamente 90% de confluencia (Figura 38 A). Se estandarizó la concentración celular de fibroblastos que se utilizaría en los ensayos de proliferación mediante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio), y se definió que se utilizaría un conteo inicial de  $1 \times 10^5$  (Figura 38 B). Además, se buscó el medio en el que se obtuvieran mayores valores de absorbancia. Una vez realizado el ensayo MTT, se definió trabajar en el medio DMEM para la incubación con MTT (Figura 38 C).

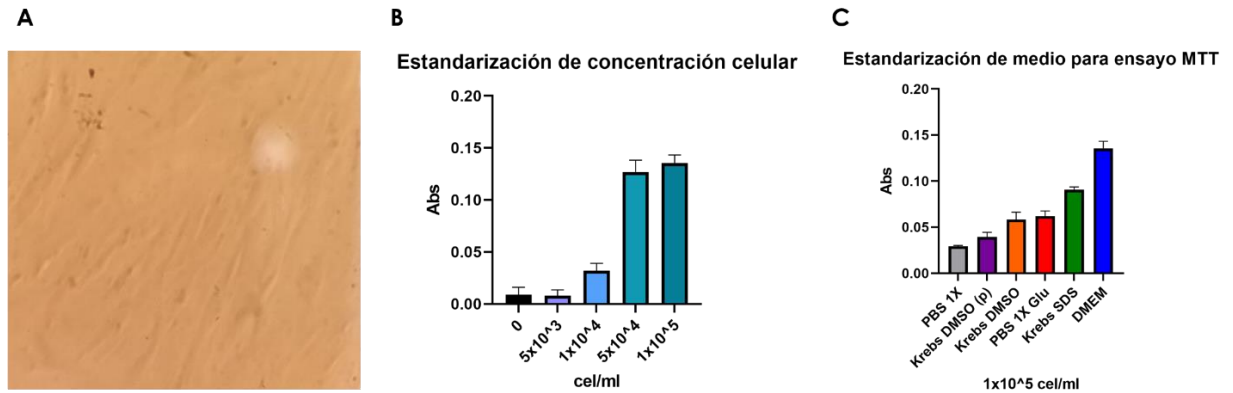


Figura 38. Estandarización del ensayo MTT para fibroblastos GM03440. A. Micrografía de fibroblastos con confluencia; B. Estandarización de la concentración celular inicial; C. Estandarización del medio para incubación en MTT.

Se evaluó por quintuplicado la proliferación con diferentes concentraciones de hEGF (Anexo 6), comparando el hEGF producido en Lemo21(DE3)-pCri-8a-IVA-hEGF con EGF comercial de Sigma Aldrich. Se observó que ambas proteínas poseen una actividad sin diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 0.005 ng/ml y 0.5 ng/ml (Figura 39), pero en la proteína comercial se observó una inhibición en valores mayores a 0.05 ng/ml, mientras que en hEGF-pCri-8a-IVA se observó un comportamiento estable con valores estadísticamente significativos con respecto a los fibroblastos sin EGF (control). Este comportamiento de la proteína recombinante corresponde al mostrado por Zheng et al (2016), en el cual se observa poca diferencia en la densidad óptica entre las concentraciones de 20 a 80 ng/ml en la línea de fibroblastos embrionarios de ratón NIH-3T3.

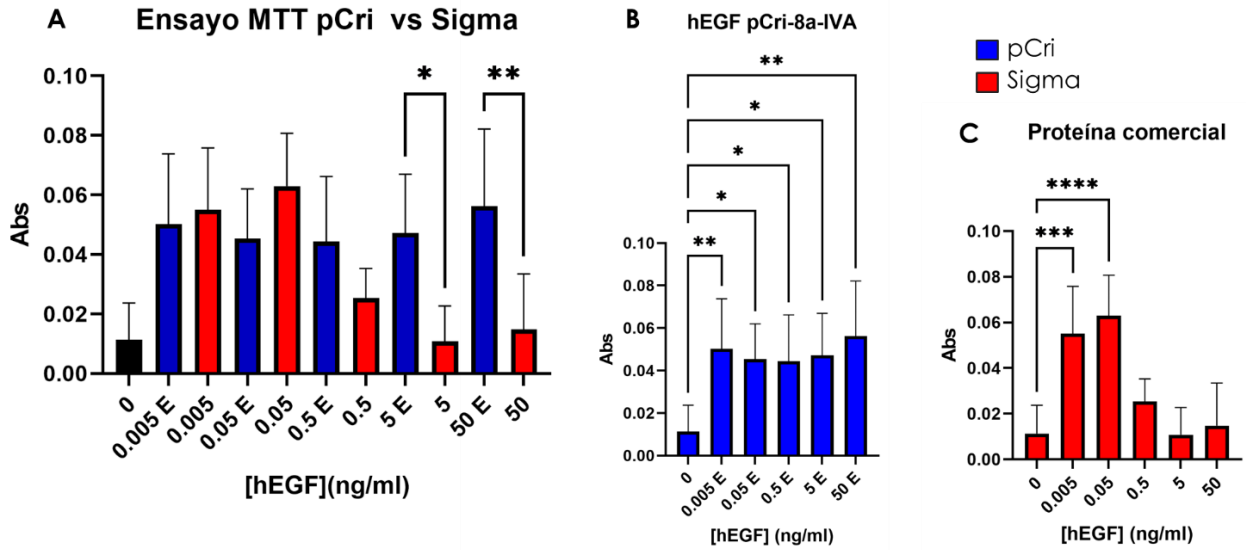


Figura 39. Ensayo de viabilidad y proliferación con MTT para fibroblastos tratados con hEGF heteróloga o comercial. Se probaron las concentraciones de 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5 y 50 ng/ml.

## 6.12 Producción de hEGF en fermentador aerobio

Se llevó la producción a 4 litros en fermentador aerobio con tanque agitado, se midió la densidad óptica a las 0, 1, 2, 4, 6 y 21 horas después de la inducción con IPTG (llevada a cabo a las 3 horas). El cultivo mostró una cinética de crecimiento exponencial, entrando a la fase estacionaria cerca de las 6 horas (Figura 40). El pH tuvo un comportamiento estable, manteniéndose cerca de un valor de 7 durante las 24 horas de cultivo (Figura 41). Una vez activada la cascada de oxígeno y agitación (alrededor de las 5 horas) el comportamiento del oxígeno y la agitación se mantuvo estable en los rangos 35 mg/l y 225 rpm respectivamente hasta las 20 horas (Figura 42).

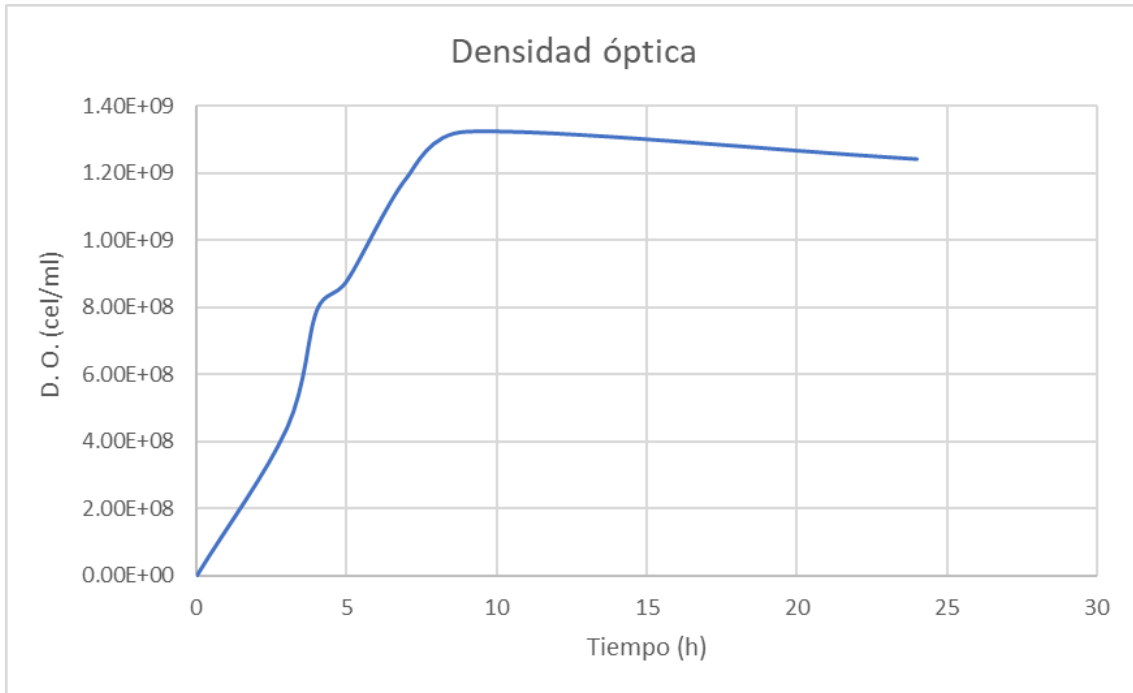


Figura 40. Cinética de crecimiento del fermentador aerobio

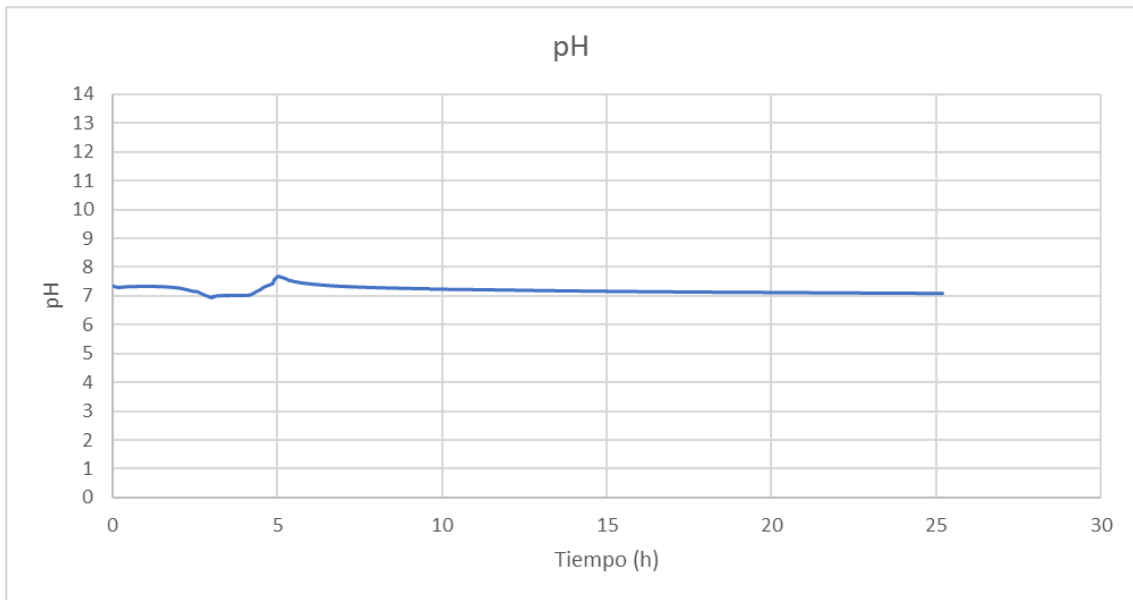


Figura 41. Cinética de pH durante la fermentación

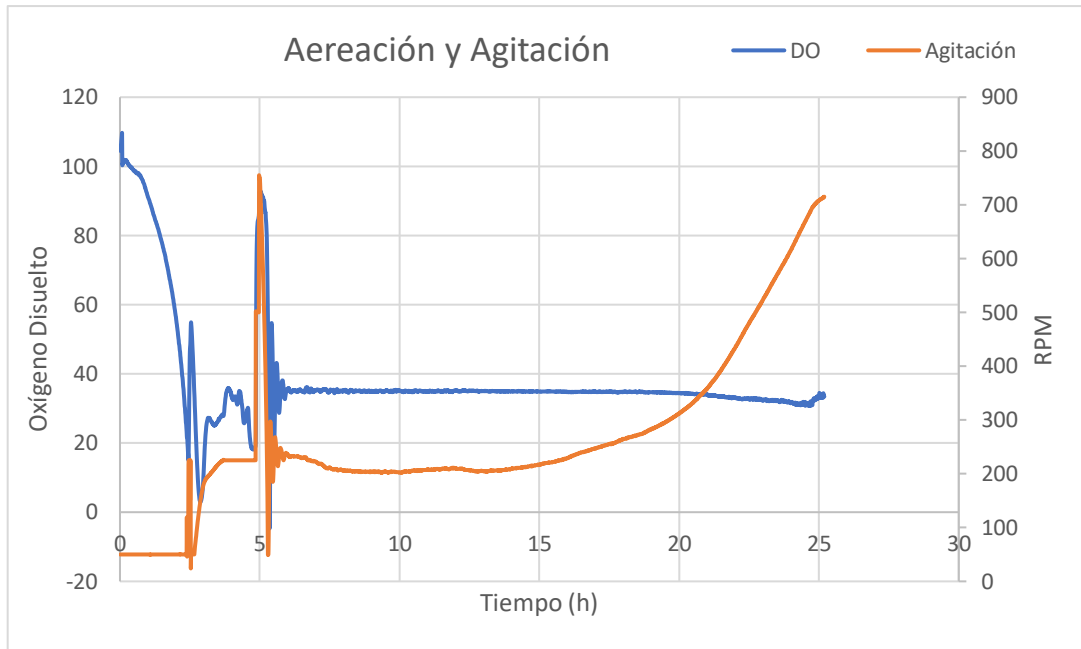


Figura 42. Cinética de aireación y agitación

Después de tomar muestras, se procesaron para separar la fracción soluble e insoluble, y se observó una banda de expresión en el tamaño correspondiente a hEGF en la fracción insoluble a partir de 1 hora después de la inducción y se mantuvo a lo largo de la fermentación.

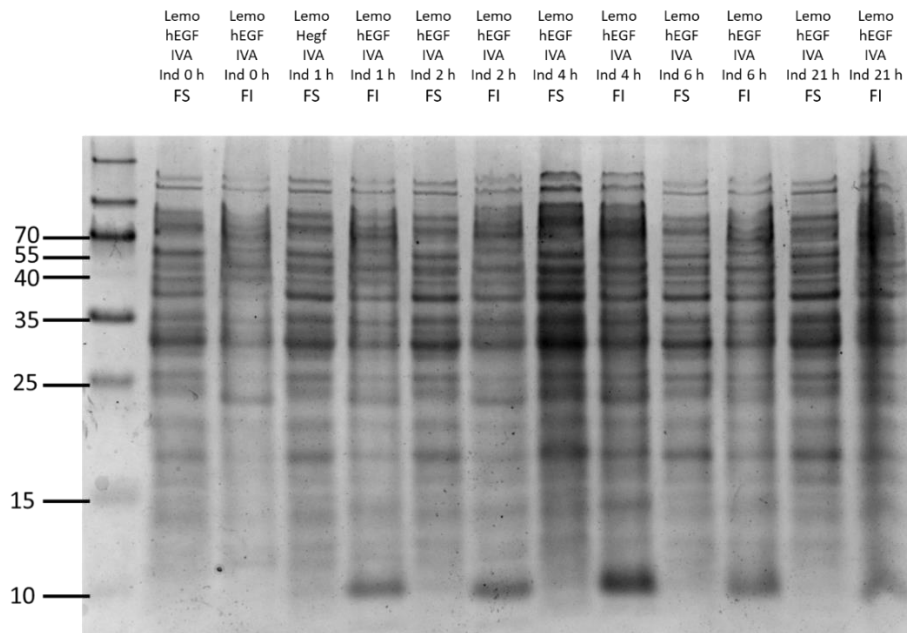


Figura 43. Cinética de expresión de hEGF en *E. coli* Lemo21(DE3) en fermentador aerobio

Se produjeron 16.2414 g de biomasa de los 4 L, obteniendo 4.06 g/L, mientras que en el cultivo en matraz se habían producido 2.6677 g/L. Después de realizar el lavado de cuerpos de inclusión se obtuvo un total de 1.1978 g, lo que equivale a 0.29945 g/L de medio.

## 7. Conclusiones

- Se ensambló el gen sintético que codifica para el factor de crecimiento epidérmico mediante ensamblaje *in vitro*.
- EGF sintético se subclonó en los vectores de expresión pCri-8a, pCri-8b, pCri-4a y pCri-12a y se comprobó su secuencia mediante Sanger.
- Se expresó la proteína fusionada hEGF-TrxA en *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pCri-4a.
- Se evaluó la expresión de hEGF en *E. coli* BL21 (DE3), SoluBL21, Shuffle, Rosseta, C43 y Lemo21 (DE3), y únicamente se expresó eficientemente en Lemo21(DE3) al inducir con IPTG 1 mM y L-rhamnosa 100  $\mu$ M.
- Se purificaron hEGF-TrxA y hEGF mediante FPLC por afinidad a níquel.
- Al realizar el ensayo de proliferación y viabilidad MTT en fibroblastos, se observó que hEGF purificado y replegado posee una actividad biológica estable en concentraciones de 0.005 a 50 ng/ml, teniendo una mejor actividad que hEGF comercial (E9644 Sigma).
- Se llevó a cabo la producción de hEGF en 4 litros de medio LB, llevando a cabo el crecimiento en un fermentador de tanque agitado.



## 8. Recomendaciones

- Se recomienda probar todas las construcciones realizadas en las diferentes cepas de expresión que se utilizaron para verificar que haya expresión.
- Optimizar el proceso de replegamiento para volúmenes más grandes, mediante el uso de membranas para diálisis.
- Para poder realizar el cálculo de parámetros cinéticos en el biorreactor, se debe realizar la fermentación por triplicado, así como realizar una curva de calibración para poder relacionar el peso seco o peso húmedo de la biomasa con la densidad óptica.
- Elaborar la formulación adecuada para poder utilizar el EGF recombinante en futuros ensayos biológicos.
- Considerar la encapsulación en nanopartículas y evaluar la actividad biológica de hEGF en las mismas.
- Realizar ensayos de actividad biológica en modelos animales como ratón.

## 9. Bibliografía

- Bichsel, K. J., Gogia, N., Malouff, T., Pena, Z., Forney, E., Hammiller, B., Watson, P., & Hansen, L. A. (2013). Role for the epidermal growth factor receptor in chemotherapy-induced alopecia. *PloS one*, 8(7), e69368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069368>
- Carpenter, G., & Cohen, S. (1976). Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *Journal of cellular physiology*, 88(2), 227–237. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040880212>
- Carpenter G, Cohen S. “Epidermal Growth Factor”. *Ann. Rev. Biochem.* 1979; 193-216.
- Cialdai, F., Risaliti, C., & Monici, M. (2022). Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.958381>
- Cohen, S., & Elliott, G. A. (1963). The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *The Journal of investigative dermatology*, 40, 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.1963.1>
- Cohen S. Nobel Lecture 1986. Epidermal growth factor. In: Frangsmyr T, Lindsten J, editors. *Physiology or medicine 1981–1990: Nobel Lectures, including presentation speeches and Laureates’ biographies* Nashville, Tennessee: Vanderbilt University, School of Medicine; 1993. p. 333–45
- Dogan, S., Demirer, S., Kepenekci, I., Erkek, B., Kiziltay, A., Hasirci, N., Müftüoğlu, S., Nazikoglu, A., Renda, N., Dincer, U. D., Elhan, A., & Kuterdem, E. (2009). Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *International wound journal*, 6(2), 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00584>.
- Esquirol Causa J, Herrero Vila E. Factor de crecimiento epidérmico, innovación y seguridad. *Med Clin (Barc)*. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2014.09.012>

- García-Nafría, J., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific reports*, 6, 27459. <https://doi.org/10.1038/srep27459>
- Ilkeli, E., Goktas Demircan, F. B., Duzgun, A. C., Arabaci, H., Uysal, A., & Kanko, M. (2022). Intralesional Epidermal Growth Factor for Diabetic Foot Ulcers. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*, 32(3), 278–282. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2022.03.278>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. *International journal of biological macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(6), 102194. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102194>
- Kong M, Hong SE. Topical use of recombinant human epidermal growthfactor (EGF)-based cream to prevent radiation dermatitis in breast cancerpatients: a single-blind randomized preliminary study. *Asian Pac J Cancer Prev*.2013;14:4859–64.
- Lebendiker, M., & Danieli, T. (2011). Purification of proteins fused to maltose-binding protein. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 681, 281–293. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_15)
- Lee, D.H., Choi, K., Cho, J., Kim, S.Y., Kwon, T.R., Choi, S.Y. ... Kim, B.J. (2014). Recombinant growth factor mixtures induce cell cycle progression and the upregulation of type I collagen in human skin fibroblasts, resulting in the acceleration of wound healing processess. *International Journal of Molecular Medicine*, 33, 1147-1152. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1698>
- Li, M., Wang, Z., Zhou, M., Zhang, C., Zhi, K., Liu, S., Sun, X., Wang, Z., Liu, J., & Liu, D. (2022). Continuous Production of Human Epidermal Growth Factor Using *Escherichia coli* Biofilm. *Frontiers in microbiology*, 13, 855059. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855059>

- Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories*, 11, 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
- Maksum, I. P., Yosua, Y., Nabel, A., Pratiwi, R. D., Sriwidodo, S., & Soedjanaatmadja, U. M. S. (2022). Refolding of bioactive human epidermal growth factor from *E. coli* BL21(DE3) inclusion bodies & evaluations on its *in vitro* & *in vivo* bioactivity. *Heliyon*, 8(4), e09306. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09306>
- McCoy, J., & Lavallie, E. (2001). Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 16, Unit16.8. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1608s28>
- Miller-Kobisher, B., Suárez-Vega, D. V., & Velazco de Maldonado, G. J. (2021). Epidermal Growth Factor in Aesthetics and Regenerative Medicine: Systematic Review. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 14(2), 137–146. [https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS\\_25\\_20](https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS_25_20)
- Nam H, Hwang BJ, Choi DY, Shin S, Choi M. Tobacco etch virus (TEV) protease with multiple mutations to improve solubility and reduce self-cleavage exhibits enhanced enzymatic activity. *FEBS Open Bio*. 2020 Apr;10(4):619-626. doi: 10.1002/2211-5463.12828. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32129006; PMCID: PMC7137792.
- Panavas, T., Sanders, C., & Butt, T. R. (2009). SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 497, 303–317. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-566-4\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-566-4_20)
- Purba, E. R., Saita, E. I., & Maruyama, I. N. (2017). Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model". *Cells*, 6(2), 13. <https://doi.org/10.3390/cells6020013>

- Ramaiah, M. J., & Kumar, K. R. (2021). mTOR-Rictor-EGFR axis in oncogenesis and diagnosis of glioblastoma multiforme. *Molecular biology reports*, 48(5), 4813–4835. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06462-2>
- Razis, A. F. A., Ismail, E. N., Hambali, Z., Abdullah, M., Ali, A. M., & Lila, M. a. M. (2007). Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli* and Characterization of its Biological Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144 (3), 249–261. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8019-9>
- Ridiandries, A., Tan, J., & Bursill, C. A. (2018). The Role of Chemokines in Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3217. <https://doi.org/10.3390/ijms19103217>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Schlegel, S., Rujas, E., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., Luirink, J., & de Gier, J. W. (2013). Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microbial cell factories*, 12, 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-24>
- Schouest JM, Luu TK, Moy RL. Improved texture and appearance of humanfacial skin after daily topical application of barley produced, synthetic,human-like epidermal growth factor (EGF) serum. *J Drugs Dermatol*. 2012;11:613–20.
- Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in enzymology*, 559, 1–15. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>
- Su, Z., Huang, Y., Zhou, Q., Wu, Z., Wu, X., Zheng, Q., Ding, C., & Li, X. (2006). High-level expression and purification of human epidermal growth factor with SUMO fusion in *Escherichia coli*. *Protein and peptide letters*, 13(8), 785–792. <https://doi.org/10.2174/092986606777841280>

- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). *Protein expression and purification*, 69(2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.017>
- Tiaka EK, Papanas N, Manolakis AC, Georgiadis GS. Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2012;24:37–44.
- Wagner, S., Klepsch, M. M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Högbom, M., van Wijk, K. J., Slotboom, D. J., Persson, J. O., & de Gier, J. W. (2008). Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14371–14376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804090105>
- Wang L, Wu X, Shi T, Lu L. Epidermal growth factor (EGF)-induced corneal epithelial wound healing through nuclear factor κB subtype-regulated CCCTC binding factor (CTCF) activation. *J Biol Chem*. 2013;288:24363–71.
- Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C., & Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Zheng, J., Huang, X. Y., & Wei, X. (2003). The effects of epidermal growth factor on the wound healing of deep partial thickness burn in rats. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi = Zhonghua Shaoshang Zazhi = Chinese Journal of Burns*, 19(5), 289-292. Retrieved from [www.scopus.com](http://www.scopus.com)
- Zheng, X., Wu, X., Fu, X., Dai, D., & Wang, F. (2016). Expression and purification of human epidermal growth factor (hEGF) fused with GB1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(4), 813–818. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1166984>
- Zhou, Y., Zhang, J., Jin, H., Chen, Z., Wu, Q., Li, W., Yue, M., Luo, C., & Wang, M. (2013). Prokaryotic expression and refolding of EGFR extracellular domain and generation of phage display human scFv against EGFR. *Biomedicine &*

*pharmacotherapy* = *Biomedicine & pharmacotherapie*, 67(8), 737–743.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.03.019>

## Anexos

### Anexo 1. Preparación de medio LB

Para 1 litro:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Extracto de levadura	5
Peptona de caseína (Tryptona)	10
NaCl	10
Agar (para placas)	15

Para medios Kanamicina, se utiliza una concentración 1 mM.



## Anexo 2. Buffer TBE 5X

### Buffer TBE 5X (1L)

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M	20 mL
Agua destilada	900 mL
pH	8.0

### Anexo 3. Reactivos para tricina SDS-PAGE

#### AB-3 Stock 49.5, 3

Reactivo	Cantidad
Acilamida	48.5 g
Bisacilamida	1.5 g
Agua destilada	40 ml, y posteriormente aforar a 100 ml

Después de su preparación se filtra.

#### Buffer ánodo 10X (1L)

Reactivo	Cantidad
Tris	121.4 g
HCl (37%)	22.5 ml

pH= 8.9

#### Buffer cátodo 10X (1L)

Reactivo	Cantidad
Tris	121.4 g
Tricina	179.17 g
SDS	10 g

pH= idealmente 8.25, pero no se debe corregir

#### Buffer de gel 3X (1L)

Reactivo	Cantidad
Tris	363.42 g
HCl	83.3 g
SDS	3 g

pH= 8.45

## **Anexo 4. Reactivos para inmunodetección por Western Blot**

### **1. Buffer de transferencia (1X, 1 L)**

Metanol 200 mL

Glicina 14.4 g

Tris Base 3.02 g

### **2. Buffer de corrida (10X, 1 L)**

Tris Base 30 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

Ajustar el pH a 8.3

### **3. Tris Buffered Saline (10X, 1L)**

Tris Base 60.6 g

NaCl 87.6 g

Ajustar pH a 7.6 con HCl concentrado

### **4. Solución de revelado para fosfatasa alcalina (por membrana)**

0.5 mL MgCl<sub>2</sub> (1M)

1 mL Tris-Cl (1M, pH 9.5)

1 mL NaCl (1M)

1.5 mL agua Milli-Q

200 µL BCIP/NBT stock (50X)

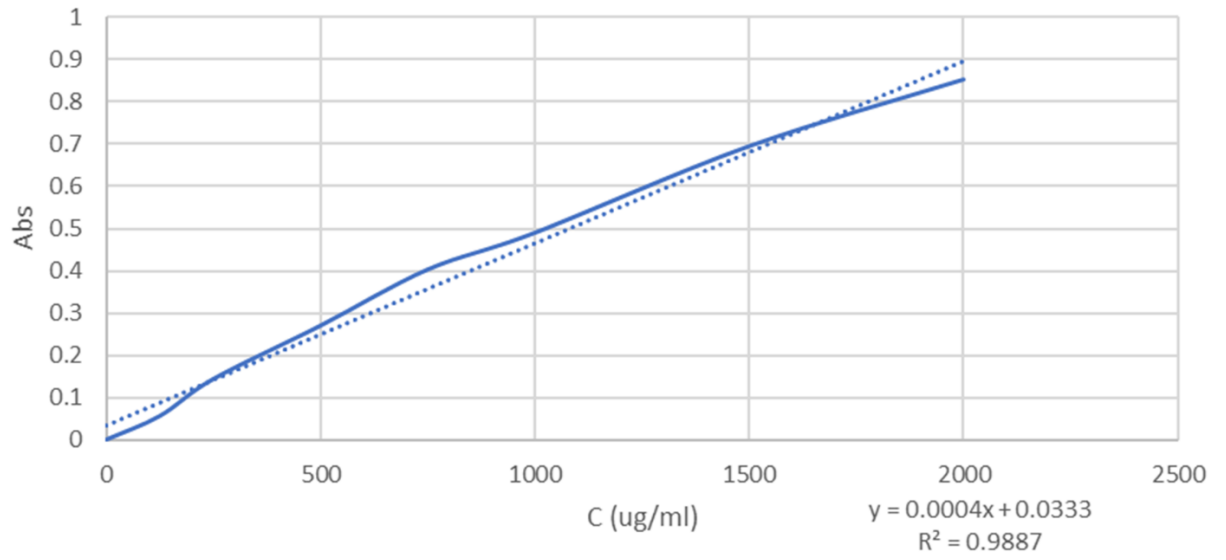
**5. Solución reveladora para HRP:** Diluir 1:5 la solución reveladora comercial con agua destilada.

**6. Solución fijadora para HRP:** Añadir 50 mL de solución A, 6 mL de solución B y aforar a 200 mL con agua destilada.

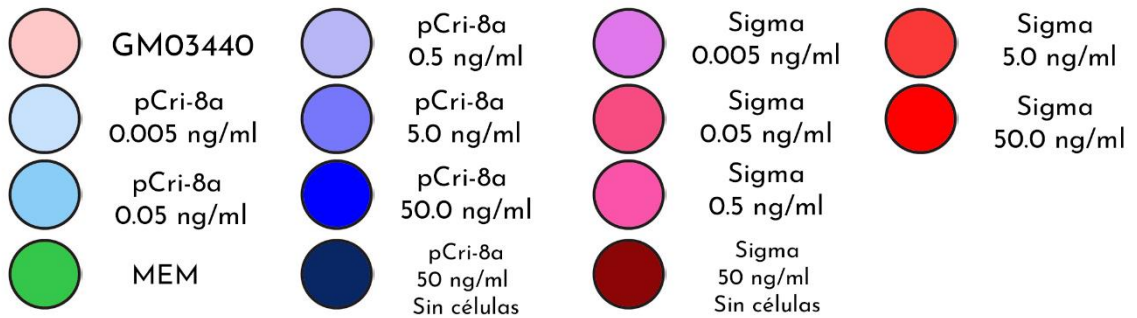
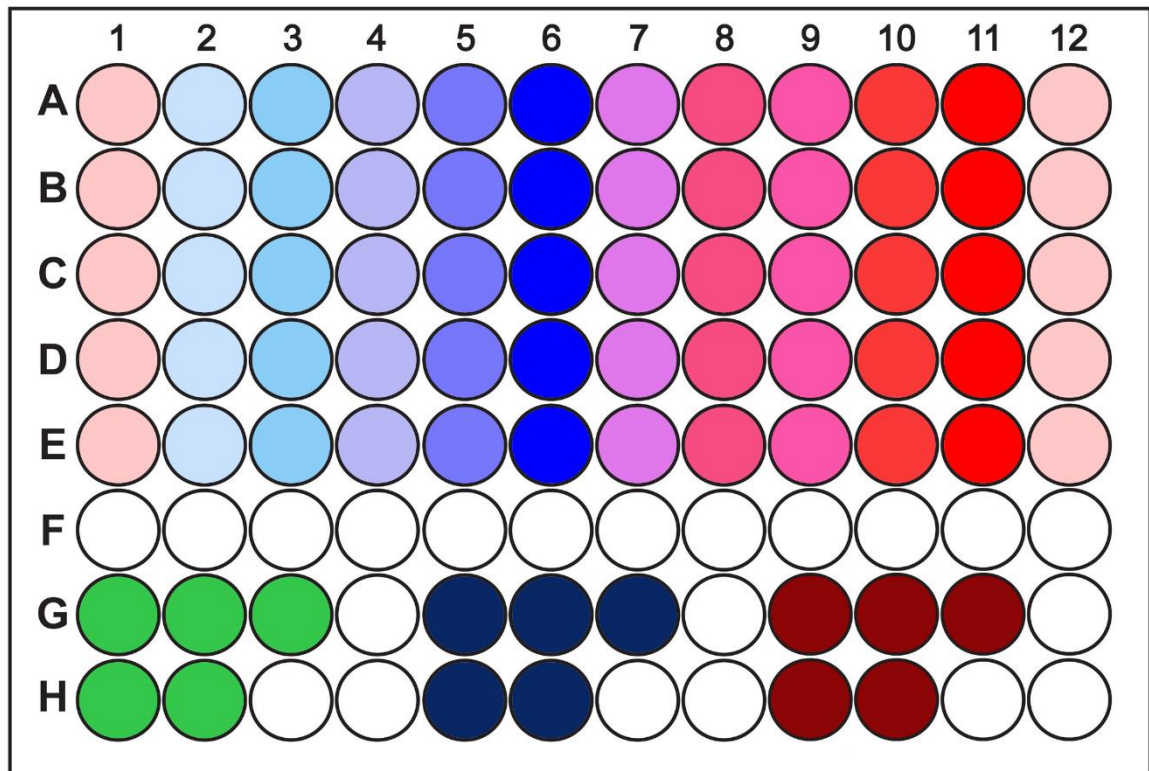
**Anexo 5. Soluciones para curva de calibración y curva de BSA en PBS 1X mediante Bradford Quick Start (Biorad).**

<b>Tubo</b>	<b>Volumen de estándar (µl)</b>	<b>Origen del estándar (BSA)</b>	<b>Volumen de diluyente</b>	<b>Concentración final [Proteína] (µg/ml)</b>
1	40	2 mg/ml stock	0	2000
2	60	2 mg/ml stock	20	1500
3	40	2 mg/ml stock	40	1000
4	40	Tubo 2	40	750
5	40	Tubo 3	40	500
6	40	Tubo 5	40	250
7	40	Tubo 6	40	125
8 (blanco)	0	-	40	0

Curva PBS 1X Bradford



## Anexo 6. Diseño del ensayo MTT para fibroblastos GM03440



## Anexo 7. Ensamblaje del biorreactor

Se debe verificar que el vaso de vidrio se encuentre limpio, de lo contrario, se debe limpiar con jabón suave, enjuagar con agua de la llave y, posteriormente, volver a enjuagar con agua destilada. Se recomienda asegurarse que todos los empaques de la tapa se encuentren lubricados con grasa de silicón o glicerol.

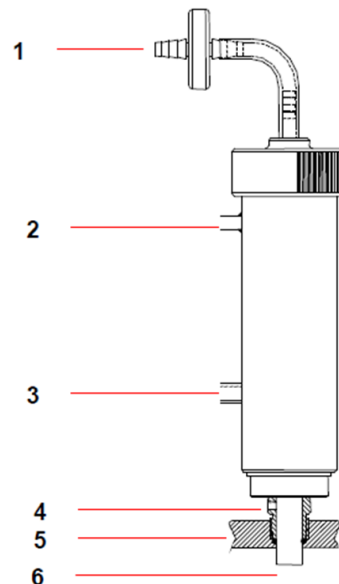
Si el bafle no se encuentra instalado, se debe apretar suavemente para que quepa en el vaso sin raspar las paredes y deslizar hasta que llegue al fondo del vas. Una vez instalado el bafle, se facilita la instalación del aspensor de aire, que se atora en el bafle. Se tapan los puertos que no van a ser utilizados con tornillos y se coloca una manguera con filtro en la entrada para la aireación. Se le deben colocar cinchos a cada manguera de silicón que se utilice.

### Antes de esterilizar

#### Instalación del condensador

El condensador se inserta en el puerto correspondiente, asegurándose de que quede fijo.

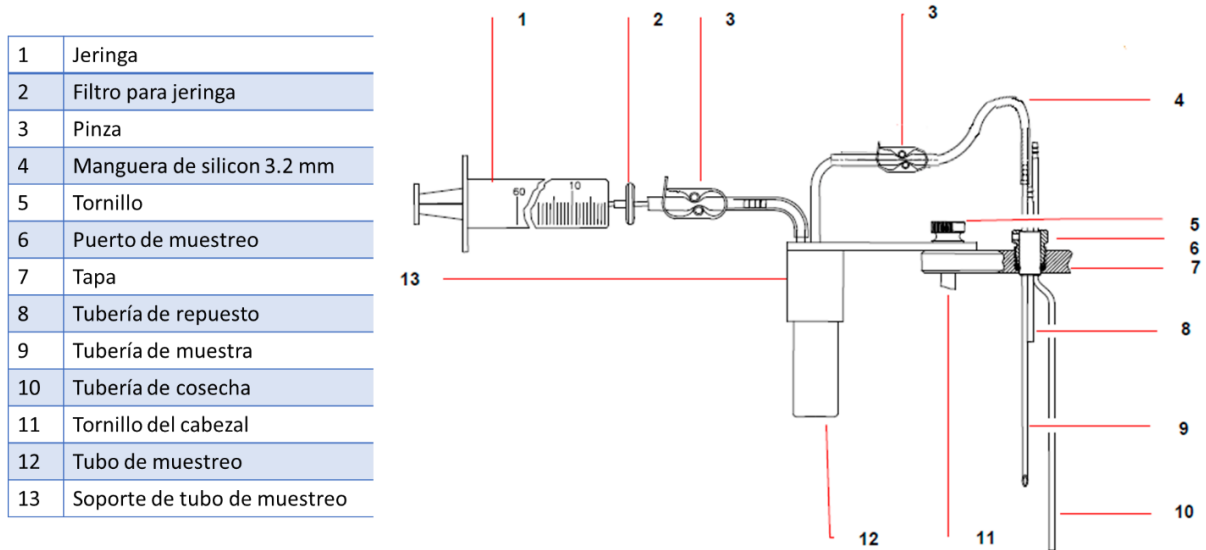
1	Filtro estéril
2	Salida de agua (Exh. Cond. Return)
3	Entrada de agua (Exh. Cond. In)
4	Tornillo del adaptador
5	Tapa del biorreactor
6	Puerto de escape



Una vez ensamblado se debe verificar que el flujo de aire no se encuentre obstruido.

## Sistema de toma de muestra

Para instalar el sistema de toma de muestra, se retira uno de los tornillos del cabezal, y se ensambla de la siguiente manera:



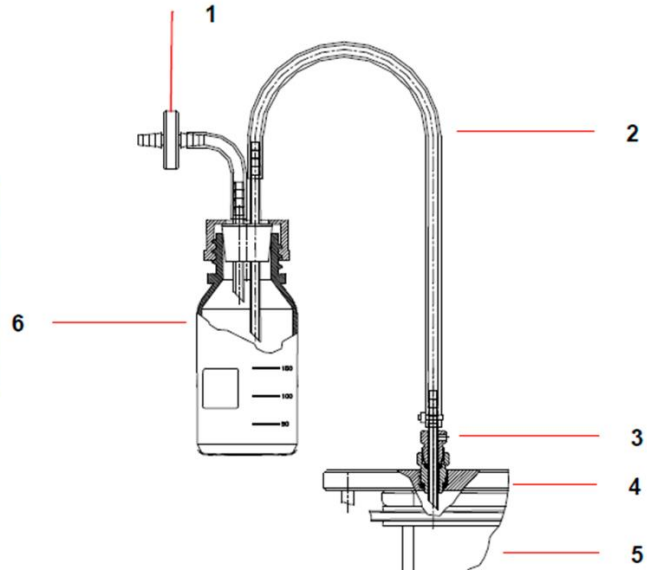
El sistema de toma de muestra se arma antes de esterilizar, pero para meter a la autoclave se desmonta del tornillo, y se vuelve a colocar una vez esterilizado.

## Sistema para bombear base

Se recomienda preparar la base antes de esterilizar en un frasco limpio, posteriormente se arma el sistema como se muestra a continuación con un frasco vacío y la base se traspasa en condiciones de esterilidad al sistema estéril.



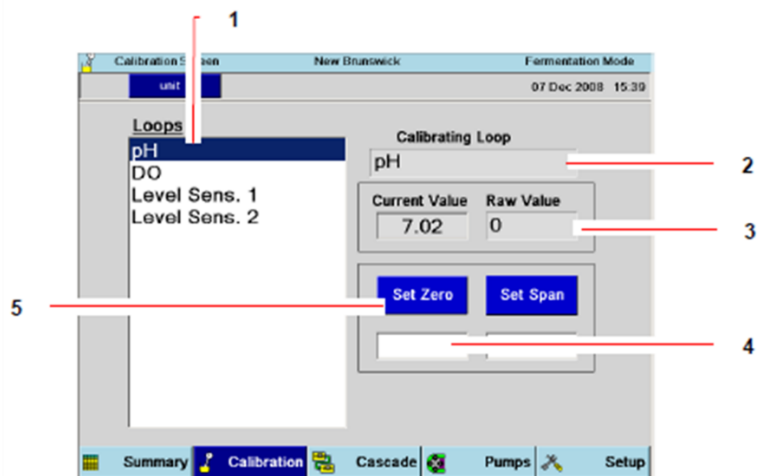
1	Filtro estéril
2	Tubo de silicón
3	Puerto
4	Tapa del biorreactor
5	Vaso
6	Botella



### Instalación y calibración de la sonda de pH

Antes de instalar en el biorreactor se calibra la sonda, para hacer esto, se debe enjuagar la sonda con agua destilada y conectar previamente al panel de control. Se enciende y se oprime “CALIBRATION” en la pantalla táctil, esto despliega el menú de calibración, se sumerge la sonda en el buffer de pH 7.0 y se deja equilibrar el sistema por unos minutos, posteriormente, se siguen los siguientes pasos:

1	Para comenzar se presiona pH
2	Aparece pH en el espacio de “Calibrating Loop”
3	Raw Value es la señal recibida, antes de ser procesada por el sistema.
4	Se escribe 7.0 en la caja y se presiona OK
5	Una vez que se estabilizan los valores (Current Value y Raw Value) se presiona “Set Zero”

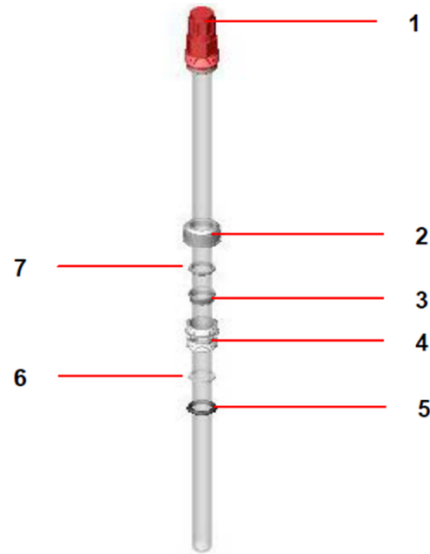


Una vez calibrado en pH 7.0, se enjuaga la sonda con agua destilada y se sumerge en el buffer de pH 4.0, dejando equilibrar el sistema por algunos minutos. Se presiona “SET SPAN” y se escribe 4.0 en la caja. Una vez que las lecturas, se estabilizan se

presiona “SET SPAN” (este proceso se puede repetir varias veces para tener una lectura más precisa).

Se revisa que la sonda esté en las condiciones correctas, se recomienda colocar glicerol para insertar en el agujero correspondiente en la tapa del biorreactor, insertando en el adaptador, se debe corroborar que la configuración de la sonda sea la siguiente:

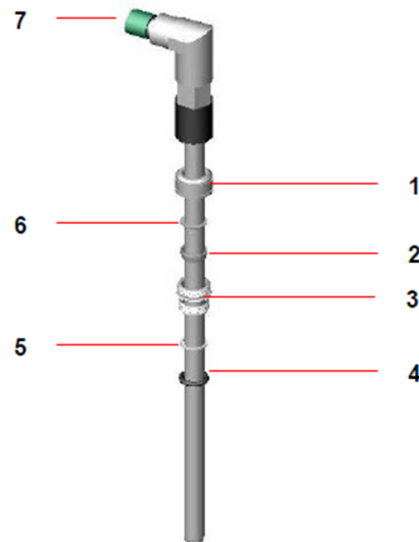
1	Tapa
2	Adaptador para sonda de pH superior
3	Anillo inferior
4	Adaptador para sonda de pH inferior
5	O-ring del puerto (negro)
6	O-ring de teflón (blanco)
7	Anillo superior



### **Instalación de la sonda de oxígeno disuelto (DO)**

Se verifica que la sonda esté en buen estado, posteriormente, se recomienda cubrirla con glicerol para ayudar a que deslice por el puerto y se ajusta la tuerca del adaptador hasta que quede fija, se debe montar de la siguiente manera antes de insertar en el puerto:

1	Adaptador para la sonda de DO (parte superior)
2	Anillo inferior
3	Adaptador para la sonda de DO (parte inferior)
4	O-ring del puerto (negro)
5	O-ring de teflón (blanco)
6	Anillo superior
7	Capuchón



## Esterilización

Para iniciar la esterilización se debe llenar el vaso con medio de cultivo, se deja ligeramente abierto un puerto para permitir la transferencia de aire y evitar diferencias de presión (éste se cubre con papel aluminio, y se cierra antes de sacar de la autoclave). Se debe verificar que las mangueras con pinzas se encuentren cerradas; todos los filtros utilizados deben ser cubiertos con papel aluminio y las sondas deben tener puestos sus capuchones.

Si el motor está puesto, se debe quitar cuidadosamente, posteriormente, se lubrica un capuchón de vinil (de color negro) y se coloca en donde va el motor (se recomienda cubrir con papel aluminio).

En caso de que se encuentren conectadas las entradas de aire, gas o conectadas las sondas, se desconectan; además, se retira el sensor de temperatura del termopozo.

Se inserta el biorreactor en la autoclave y se esteriliza por 25 minutos después de alcanzar los 121°C, se utiliza un tiempo para bajar la presión de entre 30 y 60 minutos (esto se cumple utilizando el ciclo de líquido de la autoclave).

## **Después de esterilizar**

Se cierra el puerto que se dejó entreabierto, se inserta el sensor de temperatura en el termopozo, se coloca la manguera del sistema de la base en una bomba peristáltica, se vuelve a ensamblar el sistema de toma de muestra, se retiran los capuchones de las sondas y se reemplazan con los cables correspondientes que, a su vez, son conectados al panel de control. Se conecta el tanque de oxígeno con una manguera de silicón azul a la parte trasera del panel de control, en el puerto de gas 2.

## **Instalación de chaqueta**

La chaqueta se coloca una vez esterilizado el biorreactor. Se debe conectar al panel de control y se coloca alrededor del vaso, apretando lo suficiente para que no se resbale, se cierra con el velcro.

## **Polarización y calibración de la sonda de oxígeno disuelto**

Si la sonda de oxígeno disuelto se desconectó del panel de control por más de 5 minutos, se debe conectar por seis horas al panel de control para polarizarse antes de calibrar.

Para fijar el valor de cero, se debe desconectar la sonda del panel de control, ir a la pantalla “CALIBRATION”, seleccionar DO e ingresar 0 en la caja editable de “SET ZERO”. Inmediatamente se presiona “SET ZERO” y se conecta rápidamente (no debe pasar más de un minuto).

Para fijar el valor máximo, se ingresa a la pantalla “AGIT GAUGE” y se fija un valor de “AGIT” de 50 rpm, presionando el modo AUTO. Se ingresa aire al contenedor hasta que la medición sea estable, se selecciona “DO” en la pantalla “CALIBRATION” y se fija 100 en la caja editable de “SET SPAN”, finalmente se presiona “SET SPAN”.

## **Instalación del chiller**

Se conectan las mangueras del enfriador al panel de control, verificando que el inlet corresponda al DRAIN del panel de control, y el outlet a WATER-IN

Se debe cerrar el circuito del ciclo de enfriamiento (cool loop) y el condensador, haciendo que la salida del condensador sea la entrada del ciclo de enfriamiento y la salida del enfriamiento corresponda a la entrada del condensador.